DER DNS- UND HISTON-GEHALT NORMALER UND ABNORMALER SPERMIEN

Albrecht Botzenhardt

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0006

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München
Leiter: Prof. Dr. W. Leidl

DER DNS- UND HISTON-GEHALT NORMALER UND ABNORMALER SPERMIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Albrecht Botzenhardt
aus Angerapp

München 1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. J. Boessneck
Referent:	Prof. Dr. W. Leidl
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. J. Tiews

Tag der Promotion: 11. 2. 1972

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	LITERATUR	2
I.	Physiologischer Ablauf der Spermatogenese	2
II.	Beeinflussung der Spermatogenese	3
1.	Schädigende Einflüsse allgemeiner Natur	3
2.	Schädigung durch Röntgenbestrahlung	3
III.	Aufbau und chemische Zusammensetzung des Spermienkopfes	4
IV.	Der DNS-Gehalt der Spermien	6
1.	Möglichkeiten des DNS-Nachweises	6
a)	Feulgen-Reaktion	6
b)	Ultraviolettmikrospektrophotometrie	7
2.	Der DNS-Gehalt normaler Spermien	8
3.	Änderungen des DNS-Gehaltes morphologisch normaler Spermien	8
4.	Der DNS-Gehalt abnormaler Spermien	10
V.	Der Histon-Gehalt der Spermien	11
1.	Möglichkeiten des Histon-Nachweises in einzelnen Zellen	11
a)	Extraktionsmethode	11
b)	Verhältnis Argininmoleküle : Phosphatgruppen	11
c)	Elektrophoretische und chromatographische Methoden	11
d)	Cytophotometrische Methoden	12
α)	Sakaguchi-Reaktion	12
ß)	Bromphenolblau-Reaktion (BPB)	12
γ)	Fastgreen-Färbung bei pH 8.2	12
2.	Der Histon-Gehalt normaler Spermien	13
3.	Änderungen des Histon-Gehaltes	14
C.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	16
1.	Material und Methode	16
2.	Präparatherstellung	16
3.	Fastgreen-Färbung bei pH 8.2	17

Seite

4. Arbeitsweise des verwendeten Spektralphotometers 18

a) Objektabsuchung 19

b) Reaktionskinetik 19

c) Absorptionsmaximum eines Objektes 19

5. Statistische Auswertung 19

D. ERGEBNISSE 20

I. Spermawerte 20

II. Ergebnisse der DNS-Messung 20

1. Experimentelle Einflüsse auf die DNS-Messergebnisse 20

2. Der DNS-Gehalt normaler Spermien 21

a) Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes der 5 Bullen 21

b) Vergleich des DNS-Gehaltes normaler Spermien in den einzelnen Meßperioden 22

3. Der DNS-Gehalt abnormaler Spermien 24

III. Ergebnisse der Histon-Messung 27

1. Experimentelle Einflüsse auf die Histon-Messung 27

a) Absorptionsmaximum 27

b) Reaktionskinetik 28

c) Reproduzierbarkeit der Färbung 28

d) Einfluß der Lagerung der Präparate auf die Färbung 29

2. Der Histon-Gehalt normaler Spermien 30

a) Individuelle Unterschiede des Histon-Gehaltes der 5 Bullen 30

b) Vergleich des Histon-Gehaltes normaler Spermien in den einzelnen Meßperioden 32

3. Der Histon-Gehalt abnormaler Spermien 33

E. DISKUSSION 35

F. ZUSAMMENFASSUNG 41

G. LITERATURVERZEICHNIS 45

A. EINLEITUNG

Wegen ihrer Funktion als Träger der genetischen Information gewinnen die Desoxyribonucleinsäure (DNS) der Spermien und die an sie konjugierten Histone auch bei vielen andrologischen Fragestellungen immer mehr Bedeutung. Eingehende mikrospektrophotometrische Untersuchungen, die vor allem die Klärung bestimmter Sterilitätsursachen zum Ziele hatten, zeigten, daß der DNS-Gehalt, wie auch der Histon-Gehalt infertiler Männer und Bullen niedriger und variabler war als der fertiler Individuen. Die bisherigen Untersuchungen beschränkten sich vorwiegend auf morphologisch normale Spermien, während der DNS-Gehalt mißgebildeter Spermien nur ausnahmsweise erfaßt wurde.

Es ergab sich deshalb als Zielsetzung dieser Arbeit die Frage, ob sich der DNS- und Histon-Gehalt pathologisch geformter Spermien von dem normaler Spermien unterscheidet. Da unter Umständen geringgradige Veränderungen dieser Parameter nicht in der Struktur erkennbar sind, sollte weiterhin geklärt werden, ob der DNS- und Histon-Gehalt morphologisch normaler Spermien aus Ejakulaten mit Teratospermie in Vergleich zu Spermien mit Normospermie verändert ist.

B. LITERATUR

I. DER PHYSIOLOGISCHE ABLAUF DER SPERMIOGENESE BEIM BULLEN

Auf den physiologischen Ablauf der Spermiogenese soll hier soweit eingegangen werden, als es für das Verständnis des Versuchsplans dieser Arbeit erforderlich ist.

Die Spermatogenese geht aus von den Gonozyten, aus denen die Stammspermatogonien entstehen. Diese teilen sich mitotisch und bilden im sogenannten Spermatogonienvermehrungszyklus die A-Spermatogonien, die Intermediär- und B-Spermatogonien. Aus den B-Spermatogonien entstehen durch mitotische Teilung die primären Spermatozyten. In der folgenden Reifeteilung wird die Chromosomenzahl auf den haploiden Satz reduziert. Es entstehen die sekundären Spermatozyten. Durch die sich anschließende zweite meiotische Teilung werden die Spermatiden gebildet. Die letzte Stufe bildet die Transformation der Spermatiden, die sogenannte Spermiohistogenese, in der die Germinativzellen ihre charakteristische Form erhalten (ORTAVANT 1959, BERCHTOLD 1963, HOCHEREAU DE REVIERS 1970).
Die Spermiogenese unterliegt einem regelmäßigen Zeitablauf, dem sogenannten Keimepithelzyklus. Zwischen den Entwicklungsstufen der einzelnen Generationen bestehen gesetzmäßige Beziehungen. Untersuchungen von KOEFOED-JOHNSON (1960) und ORTAVANT (1956) mit Hilfe radioaktiver Substanzen zeigen, daß bei der Spermiogenese von Beginn der ersten Reifeteilung bis zur Abstoßung in die Tubuli 40 Tage vergehen. Dabei soll die erste meiotische Teilung 17 Tage, die zweite 1,4 Tage und die Transformation 24 Tage dauern. Für die Nebenhodenpassage werden 8 bis 10 Tage angegeben (KOEFOED-JOHNSON 1960). Schädigende Einflüsse auf die Spermatogenese werden also erst nach Ablauf einer gewissen Zeitspanne manifest, deren Länge wiederum von dem Entwicklungsstadium abhängt, zu dem eine Noxe einwirkte.

II. STÖRUNGEN DER SPERMIOGENESE

1. SCHÄDIGENDE EINFLÜSSE ALLGEMEINER NATUR

An den Gonaden können zahlreiche endogene und exogene Faktoren histologisch und spermatologisch nachweisbare Schädigungen des Keimepithels hervorrufen. Zwei Zustandsbilder der Gonaden herrschen dabei pathologisch-anatomisch vor: Die Hodendegeneration und die Hodenentzündung.

Die Ursache der Hodendegeneration kann von verschiedenen Faktoren hervorgerufen werden. So zeigten sich Schwankungen der Spermaqualität nach plötzlicher Futterumstellung oder nach Verfütterung minderwertiger Rationen, sowie bei übermäßiger Ernährung (AEHNELT und HAHN 1962, ARBEITER 1963).

Weiterhin können als schädigende Einflüsse angesehen werden: Ein Mangel an Spurenelementen bzw. Vitaminen, zu hohe und zu tiefe Temperaturen, hormonale Störungen sowie gewisse Gifte (zit. aus NIEBERLE und COHRS 1962).

Schwere Allgemeinerkrankungen können zu erheblichen Degenerationsvorgängen an den Gonaden führen. Dabei ist die Spermatogenesehemmung in erster Linie eine Folge der Temperaturerhöhung (MAC LEOD 1952).

Die Hodenentzündung ist meist infektiös (Brucellen, Corynebakt. Pyogenes) bedingt, traumatische Ursachen sind selten. Dabei tritt, wahrscheinlich wieder durch die Temperaturerhöhung im Scrotum, vor allem eine Schädigung der Spermientransformation und mitunter eine Beeinträchtigung des Germinativums auf (WOLLRAB 1965, LEIDL 1966, EL AZAB 1966).

2. SCHÄDIGUNGEN DURCH RÖNTGENSTRAHLEN

Eine Anzahl von Studien an den Gonaden zeigte, daß sie zu den strahlenempfindlichsten Organen des Körpers gehören. So ergaben testikuläre Röntgenbestrahlung bereits mit geringen Strahlendosen eine Schädigung des Keimepithels, die bei allen bisher untersuchten Tieren gleich ist (OAKBERG 1964).

Am sensibelsten erwiesen sich die Spermatogonien, die vorwiegend in der Zeit der späten Interphase oder der frühen Prophase zugrunde gehen (MONESI 1962). Primäre und sekundäre Spermatozyten zeigen dagegen keine Veränderungen. Spermatiden und Spermien bleiben durch die Bestrahlung ebenfalls unbeeinflußt, was jedoch nicht bedeutet, daß nicht eine genetische Schädigung stattgefunden haben kann, die sich erst bei der Befruchtung bemerkbar macht (OAKBERG 1955).
Strahlendosen von 500 - 800 R haben eine hemmende bzw. unterbindende Wirkung auf Mitosen und bestimmte Phasen der Meiosen und können in den Germinativzellen zu Chromosomenveränderungen wie Verlust, Überfluß oder Brüchen führen. Durch eine Störung der Kernspindel während der 1. meiotischen Teilung kann es zu einer anormalen Verteilung der Chromosomen in der Anaphase kommen (RUGH 1960). Die Chromosomen verlieren ihre Gestalt, sie verklumpen, so daß die normale Teilung nicht mehr fortgesetzt werden kann (OAKBERG und DI MINNO 1960).
Morphologischer Ausdruck der Strahlenschädigung während der Spermatogenese ist die Zunahme von pathologischen Spermien im Ejakulat, vor allem solcher mit primären Mißbildungen, ca. 30 Tage nach der Bestrahlung, was auf einer Schädigung der Keimepithelzellen beruht, die sich während der Bestrahlung im Stadium der 2. meiotischen Teilung bzw. im Endstadium der 1. meiotischen Teilung befanden. Außerdem ist das Absinken der Dichte nach dem 50. Tag auf eine Beeinflussung der Spermatogonien mit Sistieren der Mitosen zurückzuführen (LEIDL 1964).

III. AUFBAU UND CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DES SPERMIENKOPFES

Die charakteristischen Substanzen im Kopf der reifen Samenzelle sind die Nucleoproteine. Sie stellen die wesentlichen Bestandteile der Chromosomen dar. Ihrer chemischen Struktur nach bestehen sie aus einer Verbindung von Desoxyribonucleinsäure (DNS) und basischem Protein von histon- oder protaminähnlichem Charakter (MANN 1964). Nucleinsäuren und Proteine liegen in einem prozentualen Verhältnis von 1 : 1 vor und machen ca. 90 % der in der Samenzelle enthaltenen Masse aus. Der Rest soll aus Lipoiden, Kohlehydraten und Ribonucleinsäure (RNS) bestehen (SANDRITTER und GROSSER 1964). Die RNS kommt in Bullenspermien nur in Spu-

ren vor und kann deshalb für Messungen vernachlässigt werden (BHARGAVA et al. 1959, STOLLA 1968).

Die DNS gilt heute als einziger Bestandteil der Gene. Ihre chemische Zusammensetzung ist gekennzeichnet durch die Mononucleotide, die ihrerseits aus Phosphorsäure, einem Zucker und einer Purin- oder Pyrimidinbase bestehen (KARLSON 1962). Die räumliche Anordnung der DNS-Bausteine ermittelten WATSON und CRICK (1953). Danach handelt es sich um 2 Polynucleotidstränge, die schraubenförmig als Doppelspirale um eine gemeinsame Längsachse geschlungen sind. Die Seitenketten, die senkrecht zur Helixachse angeordnet sind, bestehen aus Purinen und Pyrimidinen, die über Wasserstoffbrücken verbunden sind.

Die DNS ist im Kopf der Samenzelle in ein argininreiches Proteingerüst (Histon, Protamin) von schwammähnlicher Struktur eingebettet, das eine gewisse Schutzfunktion ausüben soll (BRIL-PETERSEN und WESTENBRINK 1963).

Histone und Protamine gewannen in den letzten Jahren in Vererbung und Cytochemie immer mehr an Bedeutung, seit erkannt wurde, daß sie als Genregulatoren wirken können (STEDMEN und Mitarb. 1951). Außerdem sollen die Histone hemmend auf die chromosomale RNS-Synthese einwirken (ALFREY et al. 1963).

Die Protamine sind einfache Proteine. Sie haben ein niederes Molekulargewicht von 2000 - 12000, sind stark basisch und besitzen einen hohen N-Gehalt durch das starke Vorkommen von Lysin, Histidin und Arginin. Das Aminosäuremuster variiert sehr stark. Arginin ist die dominierende Aminosäure in den Protaminen mit einem Anteil bis zu 90 % (VENDRELY 1965).
Die Histone liegen zwischen den Protaminen und den höheren Proteinen, ihr Molekulargewicht beträgt 8000 - 30000. Sie enthalten alle üblichen Aminosäuren, wobei die basischen überwiegen (VENDRELY 1965).
Über Aufbau, Darstellung und Funktion der Histone gibt PHILLIPS (1962) eine ausführliche Übersicht.

Proteine mit streng basischem Charakter (Protamine, Histone) wurden bis jetzt in den Samenzellen vieler Species, vorwiegend aber bei Fischen, untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß 3 Typen von basischen Nucleoproteinen vorkommen: Der Histon - (Frosch, Karpfen), der Protamin - (Lachs, Hering) und der intermediäre Typ (Hecht). Zum Histontyp wird auch das Spermiennucleoprotein des Bullen gezählt (VENDRELY 1965, BERRY and MAYER 1960).

Wie komplex das Verhältnis Protamin zu Histon ist, zeigen die Untersuchungen von BLOCH (1962). Danach werden die Histone in jungen Keimzellen des Tintenfisches zuerst durch ein argininreiches Histon, schließlich nach der Geschlechtsreife durch 2 Protamine ersetzt, während bei der Schnecke umgekehrte Verhältnisse vorliegen. Beim Bullen berichten GLEDHILL et al. (1966) von einer Verschiebung des basischen Spermiennucleoproteins während der Spermiogenese von Histon zu argininreicherem Protein.

IV. DER DNS-GEHALT DER SPERMIEN

1. MÖGLICHKEITEN DES DNS-NACHWEISES IN EINZELNEN ZELLEN

Für die quantitative Bestimmung des DNS-Gehaltes der Einzelzelle sind besonders mikrospektrophotometrische Absorptionsmessungen im sichtbaren und im UV-Bereich geeignet. Als Maß für den DNS-Gehalt wird der von der Zelle absorbierte Lichtanteil genommen.

a) FEULGEN-REAKTION

Diese Färbemethode wurde 1924 von FEULGEN und ROSSENBECK entwickelt. Die Bindung der farblosen fuchsinschwefligen Säure - "Schiff'sches Reagenz" - erfolgt an die nach milder Säurehydrolyse mit Entfernung der Purinbasen vorliegenden Aldehydgruppen der Desoxyribose. Durch Absorptionsmessungen im sichtbaren Licht wird der dabei entstehende Feulgen-DNS-Komplex, nicht aber die DNS selbst er-

mittelt. Die Feulgenreaktion soll unter standardisierten Bedingungen für den quantitativen Nachweis der DNS gut geeignet sein (SCHWIFT 1955, LEUCHTENBERGER 1958). Sie ist aber von vielen Faktoren, wie Hydrolyse- und Färbedauer, Temperatur und Bleichdauer abhängig und wird deshalb neuerdings für die quantitative DNS-Bestimmung abgelehnt (BÄHR 1965, JANSEN und Mitarb. 1966).

b) ULTRAVIOLETTMIKROSPEKTROPHOTOMETRIE

Die Mikrospektrophotometrie im ultravioletten Licht wurde von CASPERSSON (1936) zur quantitativen und qualitativen Bestimmung organischer Verbindungen in einzelnen Zellen entwickelt. Im Gegensatz zur Feulgenreaktion werden hier ungefärbte Zellen gemessen, so daß die DNS chemisch und strukturell nicht verändert wird. Bei einer spezifischen Absorption im UV-Bereich bei 260 nm, die durch die Purin- und Pyrimidinbasen der DNS hervorgerufen wird, kann direkt auf den DNS-Gehalt geschlossen werden (SANDRITTER und GROSSER 1964). Die Absorption der Eiweißkörper, beruhend auf den Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, wird bei 280 nm die unspezifische Absorption durch Streulicht usw. bei 313 nm gemessen. Bei der Berechnung des DNS-Gehaltes nach der Formel von SANDRITTER (1958) werden die Proteinabsorption und die unspezifische Absorption entsprechend berücksichtigt:

$$M = (0,92 \sum E_{260\ nm} - 0,75 \sum E_{280\ nm} - 0,25 \sum E_{313\ nm}) \times 10^{-12}\ g$$

Dabei bedeutet der Ausdruck $\sum E_{260\ nm}$ die Gesamtextinktion der Zelle bei 260 nm.

Auf eine ausführliche Darstellung über Methodik und Anwendung der Mikrospektrophotometrie sei auf SANDRITTER (1958) in "Handbuch der Histochemie" bzw. auf STOLLA (1968) in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit vorliegenden Fragen verwiesen.

2. DER DNS-GEHALT NORMALER SPERMIEN

Der DNS-Gehalt in den Zellkernen scheint weitgehend konstant und charakteristisch für jede Tierart zu sein. Untersuchungen ergaben, daß der DNS-Gehalt von normalen Zellen eng mit der Chromosomenzahl korreliert ist. Er verdoppelt sich in diploiden Zellen im Vergleich zu haploiden wie die Chromosomenzahl (BOVIN und Mitarb. 1948).

Allgemein liegt der DNS-Gehalt bei Säugern für die haploiden Zellen in der Größenordnung von $3,0 \times 10^{-12}$ g und für somatische Zellen bei $6,0 \times 10^{-12}$ g.

Die für Bullenspermien von verschiedenen Autoren ermittelten DNS-Gehalte zeigt folgende Tabelle:

DNS/Spermium $\times 10^{-12}$ g	Bestimmungs-methode	Autor
2.95	chemisch	SUMMERHILL and ODDS 1961
3.04	Feulgen-Photometrie	LEUCHTENBERGER et al. 1956
3.20	UV-Photometrie	STOLLA 1968
3.24	UV-Photometrie	SANDRITTER et al. 1960
3.30	chemisch	BHARGAVA et al. 1959
3.30	chemisch	VENDRELY and VENDRELY 1948
3.90	UV-Photometrie	WALKER and YATES 1952

1948 fanden BOVIN und Mitarbeiter, daß bei jeder Species in normalen Zellen aller Gewebe unabhängig von ihrer physiologischen Funktion die Grundmenge an DNS sehr konstant ist. Diese Erkenntnis ging als Gesetz der DNS-Konstanz in die Genetik ein.

3. ÄNDERUNGEN DES DNS-GEHALTES MORPHOLOGISCH NORMALER SPERMIEN

Unter verschiedenen physiologischen als auch pathologischen Verhältnissen treten Abweichungen von der DNS-Konstanz auf. LEUCHTENBERGER et al. (1953, 1956)

zeigen erstmals in ihren Untersuchungen an Männern und Bullen mit Hilfe der Feulgen-Cytophotometrie auf, daß eine Verminderung des DNS-Gehaltes in Spermatozoen infertiler Männer bzw. Bullen im Vergleich zu Spermatozoen fertiler Männer bzw. Bullen auftritt, die als mögliche Ursache für die Infertilität angesehen werden kann. Sie diskutieren den DNS-Abfall an Hand vergleichender Untersuchungen an Spermatiden und primären und sekundären Spermatozyten dahingehend, daß die niedereren DNS-Werte der Spermatozoen infertiler Männer nicht durch einen DNS-Verlust bei der reifen Samenzelle zustande kommen, sondern daß diese Veränderungen bereits im Keimepithel aufgetreten sein müssen.

Die obigen Beobachtungen werden durch MEYHÖFER (1963, 1965, 1968) BOSSE und MEYHÖFER (1970) bestätigt. Sie finden bei cytophotometrischen Messungen im UV-Bereich und nach Feulgen-Färbung bei Spermatozoen infertiler Männer mit Normospermie verminderte DNS-Gehalte, wobei die Streuung um den Mittelwert sehr groß ist. Diese Autoren deuten die Abweichungen der DNS-Werte dagegen nicht als echten DNS-Verlust, sondern als Veränderungen des physikochemischen Zustandes des DNS-Komplexes.

Andere Autoren (GLEDHILL 1966 a, KRAMER 1968, PAREZ et al. 1960) kommen in ihren Untersuchungen an fertilen und subfertilen Bullen zu teilweise unveränderten DNS-Werten bzw. zu erhöhten DNS-Werten gegenüber normal fruchtbaren Artgenossen. So findet GLEDHILL (1966 a) bei ejakulierten Spermien bei UV-Photometrie der DNS, Trockengewichts- und Flächenbestimmung keine Unterschiede, jedoch bei Feulgen-Cytophotometrie erhöhte Werte bei subfertilen Bullen. Er nimmt an, daß diese Divergenz in den Mittelwerten qualitative Unterschiede in allen basischen, an die DNS gebundenen Kernproteinen widerspiegelt. Solche Unterschiede könnten die Feulgen-Färbbarkeit der Spermien infertiler Bullen beeinflussen.

Abweichungen des DNS-Gehaltes vom Normalen als mögliche Ursachen der Infertilität müssen jedoch vorsichtig beurteilt werden, da bereits unter physiologischen Verhältnissen Schwankungen auftreten können.

Die Untersuchungen mittels Ultraviolettmikrospektrophotometrie von LEIDL und STOLLA (1969) und STOLLA (1970) an verschiedenen Haustieren mit normalem Spermabild zeigen, daß bereits im physiologischen Bereich signifikante individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes der Spermien einzelner Species vorkommen können,

die ohne Einwirkung auf das Befruchtungsvermögen der Spermien sind.
Nach den Untersuchungen von GLEDHILL (1966 a) und BOUTERS et al. (1967) findet an den Spermien in den samenabführenden Wegen ein Alterungsprozess statt, der sich in einem verminderten Feulgen-DNS-Gehalt niederschägt. Beim UV-DNS-Gehalt sind jedoch keine Änderungen zu finden. BOUTERS et al. (1967) glaubt, daß die Verringerung des DNS-Gehaltes nicht auf einen tatsächlichen Abfall der DNS zurückzuführen ist, sondern auf eine durch den Alterungsprozeß bedingte Abnahme des Feulgen-DNS-Gehaltes. GLEDHILL (1966 a) bringt dies mit einer qualitativen Veränderung des Desoxyribonucleoprotein-Komplexes in Zusammenhang.
Eine 30 %ige Abnahme des Feulgen-DNS-Gehaltes, sowie eine Abnahme der Befruchtungsrate von Bullenspermien, die 5 Tage bei Kühlschranktemperatur gelagert waren, finden SUMMERHILL und Mitarb. (1961). Ähnliche Beobachtungen beschreiben ANAND und Mitarb. (1967), die Alterungsprozesse der DNS ausschließen und an einen echten Abfall des DNS-Gehaltes denken. Im Gegensatz dazu konnte STOLLA (1968) bei Schweinespermien, die über 4 Tage bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt wurden, keine Veränderung des UV-DNS-Gehaltes feststellen.

4. DER DNS-GEHALT ABNORMALER SPERMIEN

Der Großteil der bisherigen Untersuchungen wurde an morphologisch normal aussehenden Spermien durchgeführt. Die wenigen Untersuchungen an morphologisch mißgebildeten Spermien, vor allem an solchen mit primären Kopfmißbildungen und aneuploiden Spermien haben zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt. So sind nach GLEDHILL (1966 b) und GLEDHILL (1970) keine signifikanten Differenzen zwischen normalen und abnormalen Spermienköpfen festzustellen. Dagegen werden bei Feulgen-Cytophotometrie, Trockengewichts- und Flächenbestimmung Unterschiede gefunden. Diese Differenzen sollen durch eine qualitative Änderung der an die DNS gebundenen basischen Proteine hervorgerufen werden (GLEDHILL 1966 b).
Andere Autoren berichten von erheblichen Unterschieden im DNS-Gehalt bei Bullenspermien mit mißgebildeten Köpfen im Gegensatz zu morphologisch normalen Spermien (STOLLA 1970, MEYHÖFER 1963). Bei Ejakulaten mit Teratospermie findet

MEYHÖFER (1963) sowohl verminderte als auch erhöhte DNS-Gehalte, was sich in einer entsprechenden großen Streuung äußert. Während die prozentuale Streuung bei Normospermie zwischen 20 - 30 % liegt, steigt sie bei der pathologischen Spermien im Extremfall bis zu 66,5 % an. Das gemeinsame Auftreten eines anormalen DNS-Gehaltes mit schweren Deformationen des Kopfes scheint in kausalem Zusammenhang mit dem Entstehen mißgebildeter Spermien zu stehen. Die erheblich größere Streuung bei Spermien mit abnormalen Köpfen ist teilweise auf das Vorkommen von Spermien mit DNS-Gehalten im Bereich diploider Zellen zurückzuführen (STOLLA 1970, BOSSE und MEYHÖFER 1970). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Spermien mit doppeltem DNS-Gehalt und verminderter Fertilität scheint gegeben zu sein (GLEDHILL 1965). Über das spontane Vorkommen von Spermien mit diploidem DNS-Gehalt berichten auch SALISBURY and BAKER (1966) und ESNAULT und ORTAVANT (1967).

V. DER HISTON-GEHALT DER SPERMIEN

1. MÖGLICHKEITEN DES HISTON-NACHWEISES IN EINZELNEN ZELLEN

Zur Bestimmung des Histon- und Protamingehaltes sind folgende Methoden bekannt.

a) Extraktionsmethoden; eine ausführliche Übersicht findet sich bei MANN (1964).
b) Verfahren, bei denen das Verhältnis der Anzahl der Argininmoleküle zur Anzahl der Phosphatgruppen der DNS als Kriterium herangezogen werden (VENDRELY 1965).
c) Elektrophoretische und chromatographische Untersuchungen; wegen weiterer Ausführungen sei auf PHILLIPS (1962) verwiesen.

Die angeführten Bestimmungsmethoden geben jedoch nur qualitative bzw. halbquantitative Durchschnittswerte aus Zell- oder Spermienaufschwemmungen.

d) CYTOPHOTOMETRISCHE METHODEN

Zur quantitativen Bestimmung der Histone und Protamine in der Einzelzelle stehen nur wenige cytophotometrische Methoden zur Verfügung, die vorwiegend auf alkalischen Farbbindungsreaktionen basieren.

α) DIE SAKAGUCHI-REAKTION

Diese Reaktion erfaßt nur das proteingebundene Arginin. Gefärbt wird mit einer 0,05 - 0,1 %igen Lösung von Naphtolgelb. Die cytophotometrische Auswertung erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 ~ 480 nm (LEDERER und SANDRITTER 1966, GLEDHILL et al. 1966).

ß) DIE BROMPHENOLBLAU-REAKTION (BPB)

Sie erfaßt im Gegensatz zur Sakaguchi-Reaktion die gesamtbasischen Proteine und wird mit einer 0,1 %igen Lösung von BPB in 0,0035 M Borsalzpuffer bei pH 8,2 durchgeführt. Die cytophotometrische Messung erfolgt bei 592 nm. Die BPB-Reaktion zeigt zwar eine Änderung des basischen Proteingehaltes an, aber sie klärt nicht, ob es sich um eine quantitative oder nur um eine qualitative Änderung in der Zusammensetzung der basischen Proteine handelt (RINGERTZ und ZETTERBERG 1966).

δ) DIE FASTGREEN-FÄRBUNG BEI pH 8,2

Die Fastgreen-Färbung bei pH 8,2 wurde von ALFERT und GESCHWIND (1953) entwickelt. Sie verwendeten den höheren isoelektrischen Punkt der Histone zur selektiven Anfärbung mit dem Natriumsalz eines Sulfotriphenylmethans im alkalischen Bereich, dessen Absorptionsmaximum bei 620 - 650 nm liegt. Die Spezifität der Anfärbung beruht auf den Aminogruppen des Lysins und den Guanido-Gruppen des Arginins. Da im stark alkalischen Bereich nahe dem isoelektrischen Punkt der Histone gefärbt wird, stehen die übrigen Eiweißkörper (Globuline, Albumine) mit

einem niedrigeren isoelektrischen Punkt nicht für die Farbbindung zur Verfügung. Die Anfärbung am Zellkern wird erst nach der Extraktion der Nucleinsäuren mit Trichloressigsäure (ALFERT und GESCHWIND 1953) oder anderen Extraktionsmethoden positiv (ALFERT 1956).

Die Spezifität der Fastgreen-Färbung für die Histone und damit ihre Verwendung zur quantitativen Bestimmung der Histone wird von vielen Autoren als gesichert angesehen (ALFERT und GESCHWIND 1953, LEUCHTENBERGER et al. 1956, JOBST und SANDRITTER 1964, BOSSE und MEYHÖFER 1970). Allerdings verweisen diese und andere Autoren darauf, daß die Fastgreen-Färbung und damit die Reproduzierbarkeit der Färbung von vielen Faktoren, die nur schwer zu kontrollieren sind, abhängig ist. So treten selbst bei dem Färbungsprozeß in einem Arbeitsgang größere Streuungsbreiten der Farbintensität auf (ROMMEL 1960). Starken Einfluß auf die Fastgreen-Färbung haben vor allem die Differenzierung und Fixierung, wobei eine Verschiebung der Aminosäurezusammensetzung und damit eine Veränderung der Löslichkeit nicht auszuschließen ist (BLOCH und Mitarb. 1955, JOBST und SANDRITTER 1964). Auch eine Maskierung der basischen Proteine durch andere Proteine und damit eine Hemmung der Fastgreen-Anfärbbarkeit wird diskutiert (ALFERT und GESCHWIND 1953, BLOCH und Mitarb. 1960).

Die Fastgreen-Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit deshalb verwendet, weil sie auf Grund der Untersuchungen von BOSSE und MEYHÖFER (1970) für Messungen des Histon-Gehaltes der Spermien am geeignetsten schien.

2. DER HISTON-GEHALT NORMALER SPERMIEN

Eine Reihe von Geweben wurde auf den Gehalt von basischen Proteinen cytophotometrisch bestimmt (ALFERT et al. 1953, ALFERT 1956, ROMMEL 1960, JOBST und SANDRITTER 1964). Dabei zeigte sich, daß die Histone, gemessen an ihrer Anfärbbarkeit zur DNS in einem konstanten Verhältnis stehen und daß verschiedene Zellen einer Ploidiestufe derselben Species den gleichen Histon-Gehalt haben. Außerdem soll sich die Histonmenge gleichzeitig mit der DNS verdoppeln (ALFERT 1955 b), was andere Autoren allerdings in Frage stellen (IRVIN et al. 1963). Es

scheint aber berechtigt, das Gesetz der DNS-Konstanz auf die Histone zu übertragen (KRAUS 1963).

Es ist schwer, den Gehalt an basischen Proteinen in absoluten, vergleichbaren Werten darzustellen, da die Bestimmungsmethoden und damit die Meßeinheiten sehr unterschiedlich sind. LEUCHTENBERGER et al. (1956) geben den Argininggehalt der Bullenspermien mit $2,07 \times 10^{-12}$ g und den DNS-Gehalt mit $3,04 \times 10^{-12}$ g an. VENDRELY und Mitarb. (1953) berechnen den Argininggehalt mit $2,16 \times 10^{-12}$ g, den DNS-Gehalt mit $3,20 \times 10^{-12}$ g. Es liegt somit ein DNS : Argininverhältnis von 1,48 : 1 vor. Cytophotometrische Bestimmungen mit Färbemethoden drücken den basischen Proteingehalt in Arbeitseinheiten aus und sind auf Grund der unterschiedlichen Färbemethoden ebenfalls schwer miteinander zu vergleichen (JOBST und SANDRITTER 1964, GLEDHILL 1966a, BOSSE und MEYHÖFER 1970).

3. ÄNDERUNGEN DES HISTON-GEHALTES

Die Ergebnisse cytophotometrischer Untersuchungen einiger Autoren deuten darauf hin, daß der Histon-Gehalt, ebenso wie der DNS-Gehalt gewissen Schwankungen unterliegen kann. So fanden bereits LEUCHTENBERGER et al. (1956), daß zwar Spermien fertiler Bullen mit konstantem DNS-Gehalt auch einen konstanten Argininggehalt haben. Spermien infertiler Bullen dagegen mit variableren und niedrigeren DNS-Gehalten besitzen einen ebenfalls variableren aber gewöhnlich höheren Argininggehalt als Spermien fertiler Bullen. MEYHÖFER (1965) und BOSSE und Mitarb. (1970) beobachteten im Vergleich zu fertilen Kontrollpersonen bei subfertilen Männern teils eine Erhöhung, teils eine Verminderung des nach Fastgreen gefärbten Histonkomplexes.

GLEDHILL et al. (1966) berichten von leicht verminderten Werten für proteingebundenes Arginin bei infertilen Bullen, nachgewiesen mit der Sakaguchi-Reaktion, während sie mit Hilfe der Bromphenolblau-Reaktion für das gesamte basische Protein erhöhte Werte finden.

Die Ergebnisse der Fastgreen-Färbung sind jedoch vorsichtig zu beurteilen, da

wie bereits ausgeführt, die Standardisierung der Färbung nur sehr schwer gelingt. Außerdem kann eine Veränderung der Anfärbbarkeit durch eine strukturelle Änderung der anfärbbaren Gruppen hervorgerufen werden (ALFERT 1955 a). NOESKE und EBNER (1965) diskutieren eine degenerative Umgruppierung der basischen Kernproteine mit Freisetzung der fastgreenfärbbaren Gruppen, die eine Zunahme des Fastgreen-Wertes bewirken. Nach ENESCO (1968) scheint eine Alterung von Geweben keine Änderung der Färbbarkeit zu bewirken.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. MATERIAL UND METHODE

Die Untersuchungen wurden an 5 Höhenfleckviehbullen im Alter von 12 - 24 Monaten durchgeführt. Sie wurden regelmäßig zur Samengewinnung herangezogen und zeigten vor Versuchsbeginn im Spermabild keine Besonderheiten.
Die Hoden der 5 Bullen wurden mit 500 R bestrahlt (Müller RT 200, Therapiegerät, 200 KV, 20 mA, 0,5 mm Cu-Filter, Feldgröße für beide Hoden 20 x 24 cm, Fokus-Haut-Abstand 50 cm, Bestrahlungszeit 4 Min. 40 Sek.). Die Tiere wurden dazu nach Sedierung mit Rompun (Bayer Leverkusen) auf einem kippbaren Operationstisch abgelegt; Abdomen und Hinterextremitäten wurden mit einer Bleischürze (0,5 mm) abgedeckt.
Die Gewinnung der Ejakulate erfolgte regelmäßig mit Hilfe der künstlichen Scheide. Zur Messung wurden die Ejakulate vor der Bestrahlung (Kontrolle), 20 Tage (Spermatiden) und 40 Tage (Pachytän) nach der Bestrahlung verwendet. Die Spermien, die 20 bzw. 40 Tage nach der Bestrahlung gewonnen wurden, befanden sich bei einer Dauer des Keimepithelzyklus von 13,5 Tagen und der Nebenhodenpassage von 8-11 Tagen zum Zeitpunkt der Bestrahlung demnach entweder als Spermatiden im Transformations- oder als primäre Spermatozyten im Pachytänstadium. Unmittelbar nach der Gewinnung wurden die Ejakulate der üblichen mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Gemessen wurden aus jedem Zeitabschnitt der DNS- und Histon-Gehalt von 50 morphologisch normalen Spermien pro Bulle, zusätzlich dazu noch 50 Spermien mit primären Kopfmißbildungen aus der Periode 40 Tage nach der Bestrahlung. Pro Periode und Bulle wurden von jedem Ejakulat für die DNS- und Histon-Messung 3 Ausstriche hergestellt und von jedem Präparat 20, von den zwei anderen je 15 Spermien gemessen, um Zufallsbefunde auszuschließen.

2. PRÄPARATHERSTELLUNG

Sämtliche Ejakulate wurden sofort nach der Gewinnung einer 5-minütigen Reinigungs-

zentrifugierung bei 1500 U/Min. unterzogen. Das überstehende Samenplasma wurde dekantiert und das Sediment nach Zugabe einer entsprechenden Menge physiologischer Kochsalzlösung und Aufrühren mit einem Glasstab erneut bei 2000 U/Min. 15 Minuten lang zentrifugiert. Derselbe Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die gewonnenen Spermien wurden nun mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, daß sie nach Ausstreichen auf geschliffene Quarzobjektträger möglichst isoliert zu liegen kamen. Anschließend erfolgte die Lufttrocknung bei Zimmertemperatur. Die Präparate für die DNS-Messung wurden mit Glyzerin (Brechungsindex 1,455 bei 20°) und Quarzdeckglas eingedeckt; letzteres wurde mit Eukitt fixiert.

3. FASTGREEN-FÄRBUNG BEI pH 8.2 NACH ALFERT UND GESCHWIND (1953)

Die für die Fastgreen-Färbung vorbereiteten Präparate wurden nach Lufttrocknung 1 Stunde in 96 %igem Alkohol fixiert und dann wieder luftgetrocknet (JOBST und SANDRITTER 1964).

Die Präparate wurden 15 Minuten in 5 %iger Trichloressigsäure (5 g TCS kristallin in 95 ml H_2O) behandelt, die im Wasserbad auf $95^{\circ}C$ gebracht wurde und diese Temperatur während der 15 Min. konstant hielt.

Anschließend wurden die Präparate 3 mal jeweils 10 Minuten in 70 %igem Alkohol gewaschen und dazwischen in Aqua dest. gespült.

Die Färbung erfolgt 30 Minuten in 0.1 %iger Lösung von Fastgreen (Natriumsalz eines Sulfotriphenylmethans) bei pH 8,2, die mit Michaelispuffer hergestellt wird.

Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten in Michaelispuffer und darauf 3 Minuten in 96 %igem Alkohol ausgewaschen.

Die Herstellung des Michaelispuffer nach Geigy erfolgte nach folgendem Ansatz:

Stammlösung A: 19,43 g Natriumazetat und
29,43 g Veronalnatrium in 1000 ml Aqua dest. lösen.

" B: 0,1 n HCl

" C: 8,5 %ige NaCl

Der Michaelispuffer wurde auf pH 8.2 eingestellt. Dazu wurde 50 ml Stammlösung A, 22 ml - B, 20 ml - C verwendet und auf 250 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Der pH-Wert wurde nötigenfalls mit NaOH korrigiert.

4. ARBEITSWEISE DES VERWENDETEN SPEKTRALPHOTOMETERS

Die Messungen wurden an einem Universalmikrospektrophotometer (UMSP I Zeiss) durchgeführt, das Absorptionsmessungen im ultravioletten Licht zuläßt.
Die Messungen für die Bestimmung des DNS-Gehaltes wurden bei den Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 313 nm durchgeführt, die für den Histon-Gehalt bei der Wellenlänge 640 nm. Hierfür wurden folgende Einstellungen am UMSP I gewählt: Meßblende 0,5 µm, Leuchtfeldblende 2,5 µm, Objektvorschub 40 µm/Min., Papiervorschub 100 mm/Min.

Bei den Präparaten für die DNS-Messung erfolgte die Einstellung der Objekte und die Justierung des UMSP I im sichtbaren Licht bei 546 nm, für die Histon-Messung im sichtbaren Licht bei 640 nm.
Meß- und Vergleichsstrahlengang wurden mit Hilfe eines Oszillographen abgestimmt. Nach dem Durchgang eines Spermienkopfes wurde der Meßvorgang automatisch abgebrochen, so daß der Spermienschwanz nicht mehr in den Meßvorgang miteinbezogen wurde.
Aus der Formel nach SANDRITTER (1958) wurde der absolute DNS-Gehalt berechnet:

$$M = (0,92 \sum E\ 260\ nm - 0,75 \sum E\ 280\ nm - 0,25 \sum E\ 313\ nm) \times 10^{-12}\ g$$

Der Histon-Gehalt wurde in Arbeitseinheiten ausgedrückt, die die Gesamtextinktion der Zelle bei 640 nm darstellen und sich nach folgender Formel errechnet:

$$E_{ges} = J \times K_J \times K_v \times \Delta$$

J = Integralwert der Extinktion
K_J = Integrationskonstante
K_v = Vorschubkonstante = $\frac{\text{Objektvorschub } \mu m}{\text{Papiervorschub } cm}$
Δ = Zeilenabstand µm

Für die Untersuchungen wurden drei verschiedene Meßverfahren mit dem UMSP I durchgeführt.

a) Objektabsuchung

Diese Art der Messung wurde in der vorliegenden Arbeit für die DNS- und Histonmessung durchgeführt. Dabei wird die Zelle bei konstanter Wellenlänge durch einen Präzisionsverschiebetisch mäanderförmig im Lichtbündel bewegt, so daß der ganze Spermienkopf vom Lichtstrahl abgetastet wird. Synchron wird auf Diagrammpapier die Transmissionskurve aufgezeichnet und gleichzeitig erfolgt die integrierende Aufzeichnung der Extinktion, so daß nach Abschluß des Meßvorganges die Gesamtextinktion in Arbeitseinheiten abgelesen werden kann.

b) Reaktionskinetik

Um zu überprüfen, ob durch die Strahlenbelastung während des Meßvorganges bei der Histon-Bestimmung die chemische Struktur der Samenzelle verändert wird, wurde bei gleichbleibender Wellenlänge von 640 nm eine Stelle des Präparates 10 Minuten dem Lichtstrahl ausgesetzt.

c) Absorptionsmaximum eines Objektes

Das Absorptionsmaximum der mit Fastgreen gefärbten Spermien wurde ermittelt, indem bei ständiger Veränderung der Wellenlänge eine Stelle des Präparates gemessen wurde.

5. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung, (Varianzanalyse und Berechnung der Signifikanz der Differenzen von den Gruppenmittelwerten mit Hilfe des Tukey-Testes) wurde nach SNEDECOR (1962) vorgenommen.

D. ERGEBNISSE

1. SPERMAWERTE

Die mikroskopische Untersuchung der Einzelejakulate 20 Tage nach der Bestrahlung zeigt im Vergleich zu der Kontrolle bei sämtlichen Bullen keine Unterschiede in den Spermawerten. Zu einem Anstieg der pathologischen Spermien, vor allem der primären Mißbildungen, kam es erst bei den 40 Tage nach der Bestrahlung gewonnenen Ejakulaten.

Tabelle 1: Spermawerte aus der Kontrolle und 40 Tage nach der Bestrahlung

	Bulle Nr.	Volumen ml	Vorwärtsbewegung %	Dichte $10^6/mm^3$	prim. Mißbildungen %	Gesamtmißbildungen %
	36	4.5	70	1.0	1.6	4.9
	37	3.0	70	1.0	1.4	4.2
I	38	7.5	75	0.8	1.0	7.0
	39	4.5	75	1.6	2.0	6.9
	41	1.5	65	1.2	1.0	2.2
	36	6.5	55	0.7	9.0	21.9
	37	4.8	60	0,8	12.3	17.3
II	38	6.0	65	1.0	12.0	20.4
	39	6.5	60	0.8	10.1	19.4
	41	2.0	40	0.6	8.3	15.6

I = Kontrolle II = 40 Tage nach der Bestrahlung

II. ERGEBNISSE DER DNS-MESSUNG

1. EXPERIMENTELLE EINFLÜSSE AUF DIE DNS-MESSERGEBNISSE

Um den Einfluß der Aufbewahrungszeit der Präparate bis zur Messung zu untersu-

chen, wurden von jedem Ejakulat der Kontrolle 3 Ausstriche angefertigt. Pro Ausstrich wurden je 15 bzw. 20 Spermien an verschiedenen Tagen gemessen. Die statistische Auswertung der Meßergebnisse für die verschiedenen Meßtage ergibt für keinen Bullen einen signifikanten Unterschied zwischen den Präparaten mit unterschiedlicher Lagerungszeit.

Tabelle 2: Durchschnitts-DNS-Gehalte ($x\ 10^{-12}$ g) der Spermien nach unterschiedlicher Lagerungszeit der Ausstriche (2 Bullen, je 1 Ejakulat, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

	1	4	7 (Tage)
Bulle I	3.08 ± 0.03	3.19 ± 0.04	3.10 ± 0.05
Bulle II	3.11 ± 0.03	3.11 ± 0.03	3.12 ± 0.04
Zahl d. gemessenen Spermien	20	15	15

2. DER DNS-GEHALT NORMALER SPERMIEN

Die Bestimmung des DNS-Gehaltes morphologisch normaler Spermien wurde in allen 3 Meßperioden durchgeführt (Tab. 4).

a) INDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE DES DNS-GEHALTES DER 5 BULLEN

Bei der hier untersuchten Species wurden in der Kontrollperiode individuell bedingte Differenzen des mittleren DNS-Gehaltes festgestellt (Tab. 3). Ein Bulle (Nr. 38) zeigt einen Mittelwert, der sich signifikant ($P < 0.05$) von 2 anderen Bullen (Nr. 38, Nr. 41) unterschied.

Tabelle 3: Individuelle Unterschiede des DNS-Gehaltes (x 10^{-12} g) der Spermien der 5 Bullen

Bulle Nr.	$\bar{x} \pm s$	Differenz zu 37	38	39	41
36	3.12 ± 0.16	-0.01	-0.08*	-0.03	0.00
37	3.13 ± 0.12		-0.07	-0.05	-0.01
38	3.20 ± 0.17			0.05	0.08*
39	3.15 ± 0.19				0.03
41	3.12 ± 0.13				

* $P < 0.05$

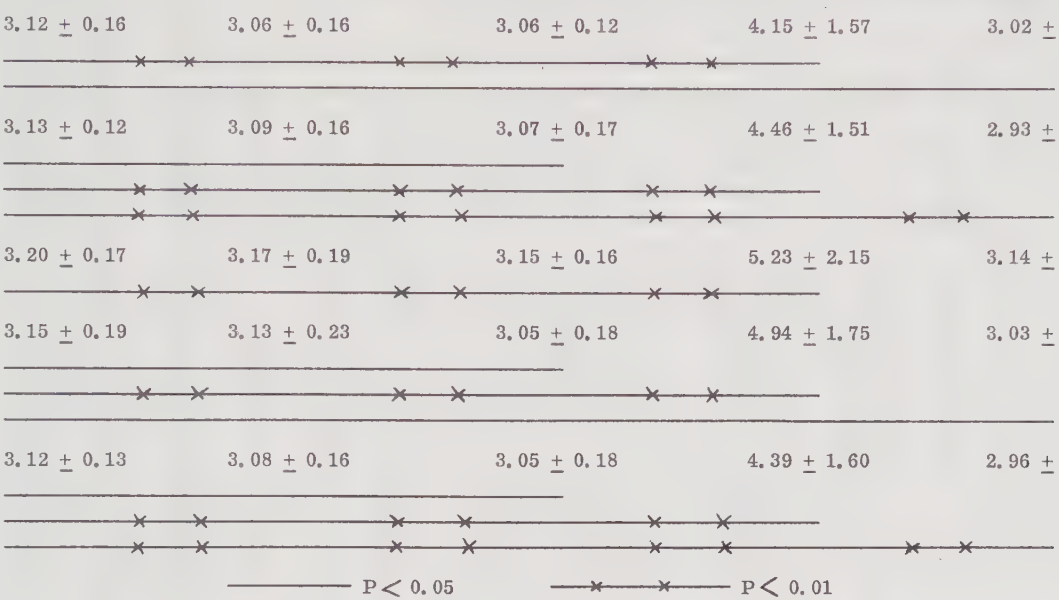
b) VERGLEICH DES DNS-GEHALTES NORMALER SPERMIEN IN DEN EINZELNEN MESSPERIODEN

Dieser Arbeit lag unter anderem die Frage zugrunde, ob Unterschiede bestehen zwischen morphologisch normalen Spermien aus Ejakulaten mit Normospermie und ebensolchen Spermien aus Ejakulaten mit hohem Anteil an pathologischen Spermien. Aus der Tabelle 4 ist ersichtlich, daß die mittleren DNS-Gehalte der Spermien aus der Zeit 20 Tage nach der Bestrahlung bei allen Bullen zwar niederer sind als die der Kontrollperiode. Die Unterschiede erwiesen sich jedoch in der statistischen Auswertung als nicht signifikant ($P \geq 0.05$)

Auch die mittleren DNS-Gehalte der normalen Spermien, die 40 Tage nach Bestrahlung gewonnen wurden, liegen bei allen Bullen wesentlich niedriger als die DNS-Gehalte aus der Kontrollperiode. Die Durchschnitts-DNS-Gehalte bei 3 Bullen weisen signifikante Differenzen ($P < 0.01$ bzw. $P < 0.05$) des mittleren DNS-Gehaltes zwischen der Kontrolle und den 40 Tagen nach der Bestrahlung gewonnenen Spermien. Faßt man hingegen alle DNS-Werte der 5 untersuchten Bullen pro Meßperiode zusammen (Tab. 5) und vergleicht die so erhaltenen mittleren DNS-Gehalte der

Tabelle 4: Der DNS-Gehalt (x 10^{-12} g) normaler und abnormaler Spermien

Bulle Nr.	Kontrolle $\bar{x} \pm s$	20 Tg. n. Bestrahlg. norm. Spermien $\bar{x} \pm s$	40 Tg. n. Bestrahlg. norm. Spermien $\bar{x} \pm s$	40 Tg. n. Bestrahlg. abnorm. Spermien $\bar{x} \pm s$	40 Tg. n. Bestrahlg. ohne "diploide" $\bar{x} \pm s$
36	3.12 ± 0.16	3.06 ± 0.16	3.06 ± 0.12	4.15 ± 1.57	3.02 ± 0.21
37	3.13 ± 0.12	3.09 ± 0.16	3.07 ± 0.17	4.46 ± 1.51	2.93 ± 0.20
38	3.20 ± 0.17	3.17 ± 0.19	3.15 ± 0.16	5.23 ± 2.15	3.14 ± 0.24
39	3.15 ± 0.19	3.13 ± 0.23	3.05 ± 0.18	4.94 ± 1.75	3.03 ± 0.24
41	3.12 ± 0.13	3.08 ± 0.16	3.05 ± 0.18	4.39 ± 1.60	2.96 ± 0.15



einzelnen Meßperioden miteinander, so ergeben sich im Gegensatz zu der nach Bullen getrennten statistischen Auswertung weder zwischen den Durchschnitts-DNS-Gehalten der Kontrolle und den 20 Tage nach Bestrahlung gewonnenen Spermien noch zwischen der Kontrolle und dem mittleren DNS-Gehalt der 40 Tage nach Bestrahlung gewonnenen Spermien signifikante Differenzen.

Tabelle 5: Der DNS-Gehalt morphologisch normaler und abnormaler Spermien aller Bullen pro Meßperiode

Gruppe	Gewinng. d. Spermien p. irrad./Tg.	Stadium z. Zt. d. Bestrahlg.	Morphologie d. Spermien	Zahl d. Sperm.	DNS $\bar{x} \pm s_{\bar{x}} \times 10^{-12}$ g
A	vor	Kontrolle	normal	250	3.14 ± 0.02
B	20	Spermatiden	normal	250	3.10 ± 0.02
C	40	Pachytän	normal	250	3.07 ± 0.02
D	40	Pachytän	mißgebildet	250	4.63 ± 0.25
$D_1(D-D_2)$		davon	"haploid"	120	3.01 ± 0.02
$D_2(D-D_1)$			"diploid"	130	6.13 ± 0.10

Differenzen zwischen D und A, B, C $P < 0.01$

D_1 und A $P < 0.05$

D_2 und A $P < 0.01$

D_1 und D_2 $P < 0.01$

3. DER DNS-GEHALT ABNORMALER SPERMIEN

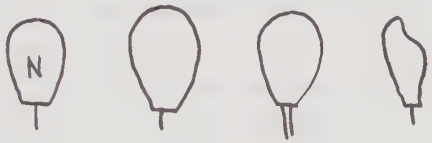
Grundlage für die Auswahl der morphologisch abnormalen Spermien für die DNS-Bestimmung war die einfache Einteilung in primäre und sekundäre Mißbildungen ohne weitere Gruppierungen, wobei im wesentlichen der seit Jahren bewährten Systematik von GÖTZE (1949) gefolgt wurde. Es wurden nur Spermien mit primären Mißbildungen zur Messung herangezogen, die aus Ejakulaten stammten, die 40 Tage nach der Bestrahlung gewonnen wurden. Gemessen wurden wieder 50 Spermien

pro Bulle. Folgende Skizze soll die häufiger vorkommenden Mißbildungen verdeutlichen, wobei festgestellt werden muß, daß eine typische Form von Spermienanomalien nicht gefunden wurde.

Skizze: Formen primärer Kopfmißbildungen nach Röntgenbestrahlung

Spermien mit
haploiden DNS-Werten

Spermien mit
"diploiden" DNS-Werten



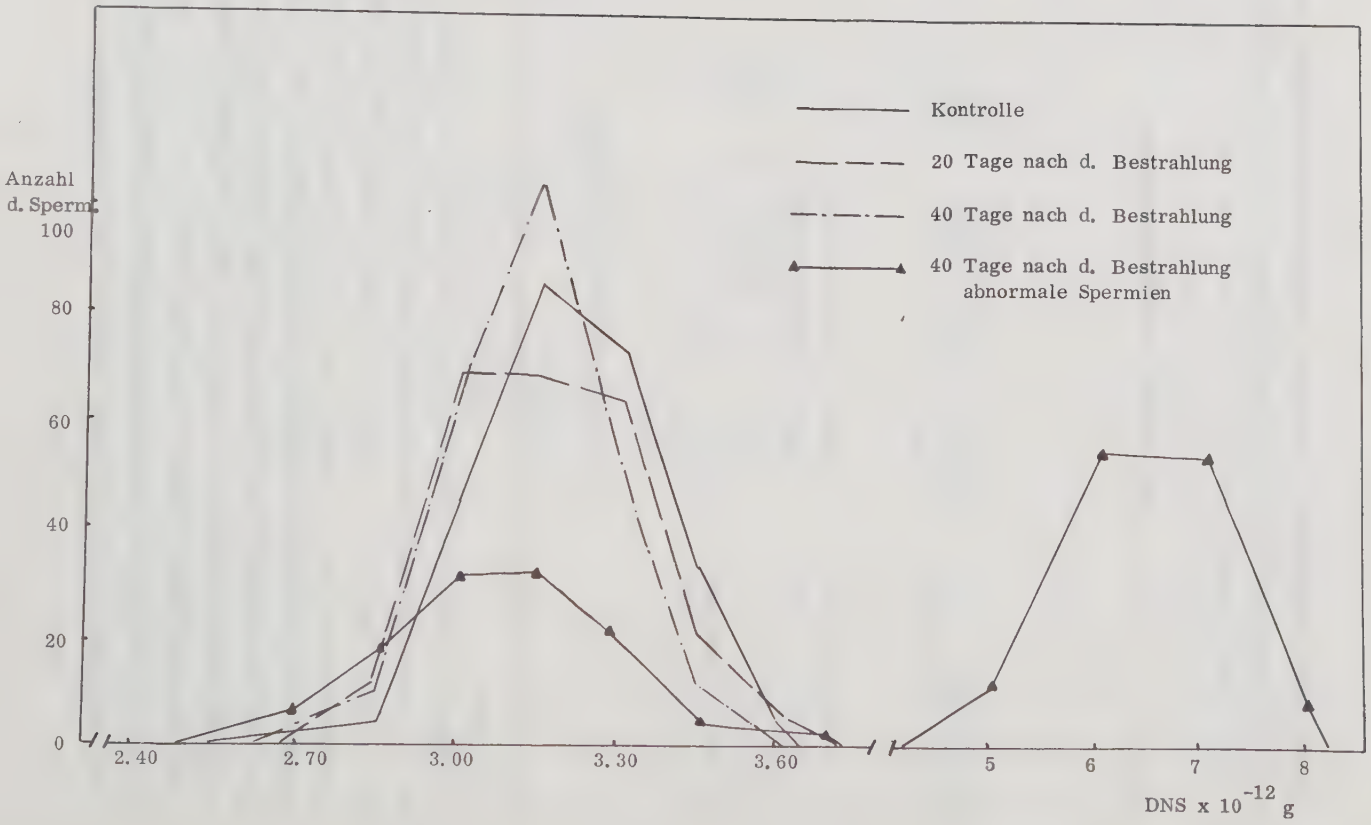
N = morphologisch normaler Spermienkopf

Die mittleren DNS-Gehalte der abnormalen Spermien sind aus den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen.

Die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte zeigt, daß 2 Populationen vorliegen (Abb. 1). Von den 250 untersuchten Spermien weisen 120 einen Wert in der Höhe haploider Zellen auf (Tab. 5, Gruppe D_1 3.01 ± 0.02), während 130 einen DNS-Gehalt diploider Zellen (Tab. 5, Gruppe D_2 6.13 ± 0.10) besitzen. Zu den diploiden Spermien wurden die Spermien zugeordnet, deren DNS-Gehalt 4.00×10^{-12} g erreichte. Es wurden dabei bei den 5 untersuchten Bullen unter 50 gemessenen, morphologisch mißgebildeten Spermien zwischen 38 % und 64 % Spermien gefunden, deren DNS-Gehalt im Bereich diploider Zellen liegt.

Der mittlere DNS-Gehalt der morphologisch mißgebildeten Spermien zeigt bei allen 5 untersuchten Bullen wesentlich erhöhte Werte (Tab. 4 und 5) gegenüber der Kon-

Abb. 1: Häufigkeitsverteilung der DNS-Werte



trollperiode, was bedingt ist durch das vermehrte Auftreten von Spermien mit DNS-Gehalten im Bereich diploider Zellen. Beachtenswert ist dabei der Variationskoeffizient ($s^{\%}$) der mißgebildeten Spermien, der bei den 5 Bullen zwischen 34 - 41 % liegt. Die Differenzen der mittleren DNS-Gehalte der Spermien zwischen der Kontrollperiode und den mißgebildeten Spermien aus der Zeit 40 Tage nach der Bestrahlung (Tab. 4) können bei allen Bullen statistisch gesichert werden ($P < 0.01$).
Werden die Spermien mit DNS-Gehalten im Bereich diploider Zellen, d. h. alle Spermien mit DNS-Werten über 4.00×10^{-12} g, ausgesondert, so erhält man gegenüber der Kontrolle stark verminderte DNS-Werte, die in 4 Fällen statistisch gesichert sind ($P < 0.01$ bzw. $P < 0.05$).
Faßt man wieder alle DNS-Werte der 5 untersuchten Bullen pro Meßperiode zusammen (Tab. 5, Gruppe D 4.63 ± 0.25, D_1 3.01 ± 0.02) und vergleicht die so erhaltenen mittleren DNS-Werte der einzelnen Meßperioden miteinander, so erhält man dieselben statistisch gesicherten Unterschiede, wie bei der nach Bullen getrennten statistischen Auswertung. Die DNS-Werte der mißgebildeten Spermien insgesamt liegen also infolge des hohen Anteils vermutlich diploider Samenzellen weit über den Kontrollwerten, während die haploiden pathologischen Formen allein einen gegenüber der Kontrolle verminderten Mittelwert aufweisen.

III. ERGEBNISSE DER HISTON-MESSUNG

1. EXPERIMENTELLE EINFLÜSSE AUF DIE HISTON-MESSUNG

a) ABSORPTIONSMAXIMUM

Um festzustellen, wo das Absorptionsmaximum für die nach Fastgreen gefärbten Histone liegt, wurden Spermien verschiedener Präparate an 3 Stellen, nämlich Spermienkopfspitze, -mitte, -ende einer Wellenlängenabsuchung unterworfen. Es ergab sich bei allen Messungen ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge von 640 nm.

b) REAKTIONSKINETIK

Es wurde ermittelt, ob die Strahlenbelastung während des Messvorganges irgendeine Veränderung der Absorption bewirkt. Dazu wurden 3 Spermien wieder an 3 Stellen wie bei Punkt III, 1. a. je 10 Minuten bei 640 nm dem Lichtstrahl ausgesetzt. Ein Abfall der Absorption konnte nicht festgestellt werden, so daß bei einer eigentlichen Meßzeit von 4 Minuten die Bestrahlung keine Fehlerquelle darstellt.

c) REPRODUZIERBARKEIT DER FÄRBUNG

Bei dem Bullen Nr. 38 wurde ein Ejakulat der Kontrollperiode daraufhin untersucht, ob bei gleichen Ausstrichen innerhalb der Präparate und zwischen den Präparaten nach identischer Aufarbeitung und Auswertung bei der Fastgreen-Färbung Abweichungen nachweisbar sind. Folgende Kontrollmessungen wurden durchgeführt:

Messung 1 50 Spermien an einer Präparatstelle
Messung 2 Wiederholungsmessung der 50 Spermien
Messung 3 50 Spermien an einer Präparatstelle dicht neben der Messung 1
Messung 4 50 Spermien an einer Präparatstelle extrem von Messung 1 und 2 enfernt
Messung 5 50 Spermien des 2. Präparates desselben Ejakulates.

Tabelle 6: Reproduzierbarkeit der Fastgreen-Färbung (Bulle 38, Kontrollperiode)

Messung Nr.	Gesamtextinktion in Arbeitseinheiten (AE) $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	s	Differenz zu 2	3	4	5
1.	11.67 ± 0.17	1.20	0.08	2.44**	-0.29	3.27**
2.	11.59 ± 0.17	1.21		2.36**	-0.37	3.19**
3.	9.23 ± 0.17	1.18			-2.73**	0.83
4.	11.96 ± 0.12	0,84				3.56**
5.	8.40 ± 0.20	1.43				---

** $P < 0.01$ Messung Nr. 1-5 = siehe Text

Es zeigt sich, daß sowohl innerhalb des Präparates, als auch unter den Präparaten statistisch gesicherte Differenzen ($P < 0.01$) bestehen, die eine Reproduzierbarkeit der Färbung nicht gewährleisten.

d) EINFLUSS DER LAGERUNG DER PRÄPARATE AUF DIE FÄRBUNG

Um eventuelle Farbverluste bei längerer Lagerung der Präparate bei Fastgreen-Färbung zu erfassen, wurden von einem Präparat 50 Spermien gemessen. Anschließend wurde dieses Präparat bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß gelagert und nach 14 Tagen nochmals 50 Spermien gemessen. Die statistische Auswertung der Messungen ergibt keine signifikanten Unterschiede.
Weiterhin war der Einfluß der Lagerung auf das fixierte Präparat bis zur Färbung zu klären. Dazu wurde ein Präparat gefärbt und 50 Spermien gemessen, ein Vergleichspräparat wurde bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß 14 Tage aufbewahrt und dann unter gleichen Bedingungen gefärbt und wieder 50 Spermien gemessen. Ein signifikanter Unterschied ($P < 0.01$) zwischen dem mittleren Histon-Gehalt des ersten Präparates (10,38 AE) und dem Vergleichspräparat (12.99 AE) wurde gefunden.

2. DER HISTON-GEHALT NORMALER SPERMIEN

Für die Bestimmung des Histon-Gehaltes wurden pro Meßperiode von jedem Bullen 3 Präparate aus einem Ejakulat in der bereits beschriebenen Weise hergestellt und nach Fastgreen unter gleichbleibenden Bedingungen gefärbt. Gemessen wurden 50 Spermien pro Bulle und Meßperiode bei der Wellenlänge 640 nm. Der Histon-Gehalt wird in Arbeitseinheiten (AE) ausgedrückt, die die Gesamtextinktion der Zelle bei 640 nm darstellt. Die Histon-Gehalte sind in Tabelle 7 enthalten.

a) INDIVIDUELLE UNTERSCHIEDE DES HISTON-GEHALTES DER 5 BULLEN

Der statistische Vergleich der Histon-Werte der Kontrollperiode aller Bullen (Tab. 8) zeigt signifikante individuelle Unterschiede ($P < 0.01$).

Tabelle 7: Das Histon-Gehalt(AE) normaler und abnormaler Spermien

Bulle Nr.	Kontrolle norm. Spermien $\bar{x} \pm s$	20 Tg. n. Bestrahlg. norm. Spermien $\bar{x} \pm s$	40 Tg. n. Bestrahlg. norm. Spermien $\bar{x} \pm s$	40 Tg. n. Bestrahlg. abnorm. Spermien $\bar{x} \pm s$
36	12.19 ± 2.17	11.07 ± 1.67	11.12 ± 0.67	13.75 ± 5.17
37	12.87 ± 1.02	10.91 ± 1.04	15.92 ± 2.64	19.75 ± 7.83
38	8.40 ± 1.43	8.05 ± 0.81	9.98 ± 1.17	12.68 ± 4.88
39	8.38 ± 1.22	8.22 ± 0.67	10.56 ± 0.97	13.79 ± 5.23
41	11.06 ± 1.51	9.30 ± 1.20	10.39 ± 0.78	13.68 ± 4.47

——— $P < 0.05$ —×—×— $P < 0.01$

Tabelle 8: Individuelle Unterschiede des Histon-Gehaltes (AE) der 5 Bullen.

Bulle Nr.	$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	s	37	38	39	41
36	12.19 ± 0.31	2.18	-0.68	3.79**	3.81**	1.13**
37	12.87 ± 0.14	1.02		4.47**	4.49**	1.81**
38	8.40 ± 0.20	1.43			0.02	-2.66**
39	8.38 ± 0.17	1.22				-2.68**
41	11.06 ± 0.21	1.51				---

** $P < 0.01$

b) VERGLEICH DES HISTON-GEHALTES NORMALER SPERMIEN IN DEN EINZELNEN MESSPERIODEN

Vergleicht man die Meßperioden miteinander, so zeigt sich, daß die Histon-Werte der Spermien aus der Zeit 20 Tage nach Bestrahlung bei allen Bullen niedriger liegen (Tab. 7) als die der Kontrollperiode. Allerdings ist nur in einem Fall (Bulle Nr. 41) ein signifikanter Unterschied festzustellen ($P < 0.01$). Die Histon-Werte aus der Zeit 40 Tage nach Bestrahlung liegen in 2 Fällen niedriger und in 3 Fällen höher als die der Kontrollperiode (Tab. 7). Die höheren Werte unterscheiden sich signifikant ($P < 0.01$ bzw. $P < 0.05$) von denen der Kontrolle.

Faßt man dagegen wieder alle Histon-Werte der 5 untersuchten Bullen pro Meßperiode zusammen (Tab. 9) und vergleicht die so erhaltenen mittleren Histon-Gehalte normaler Spermien der einzelnen Meßperioden miteinander, so erhält man im Gegensatz zu der nach Bullen getrennten statistischen Auswertung zwischen den mittleren Histon-Gehalten der Kontrolle und denen der 20 und 40 nach der Bestrahlung gewonnenen Spermien keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 9: Der Histon-Gehalt normaler und abnormaler Spermien aller Bullen pro Meßperiode

Gruppe	Gewinng. d. Spermien p. irrad. / Tage	Stadium z. Zt. d. Bestrahlg.	Morphologie d. Spermien	Zahl d. Sperm.	Gesamtextinktion in AE $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
A	vor	Kontrolle	normal	250	10.58 ± 0.15
B	20	Spermatiden	normal	250	9.51 ± 0.10
C	40	Pachytän	normal	250	11.59 ± 0.16
D	40	Pachytän	mißgebildet	250	14.73 ± 0.38
		Differenzen zwischen D und A, B, C			$P < 0.01$

3. DER HISTON-GEHALT ABNORMALER SPERMIEN

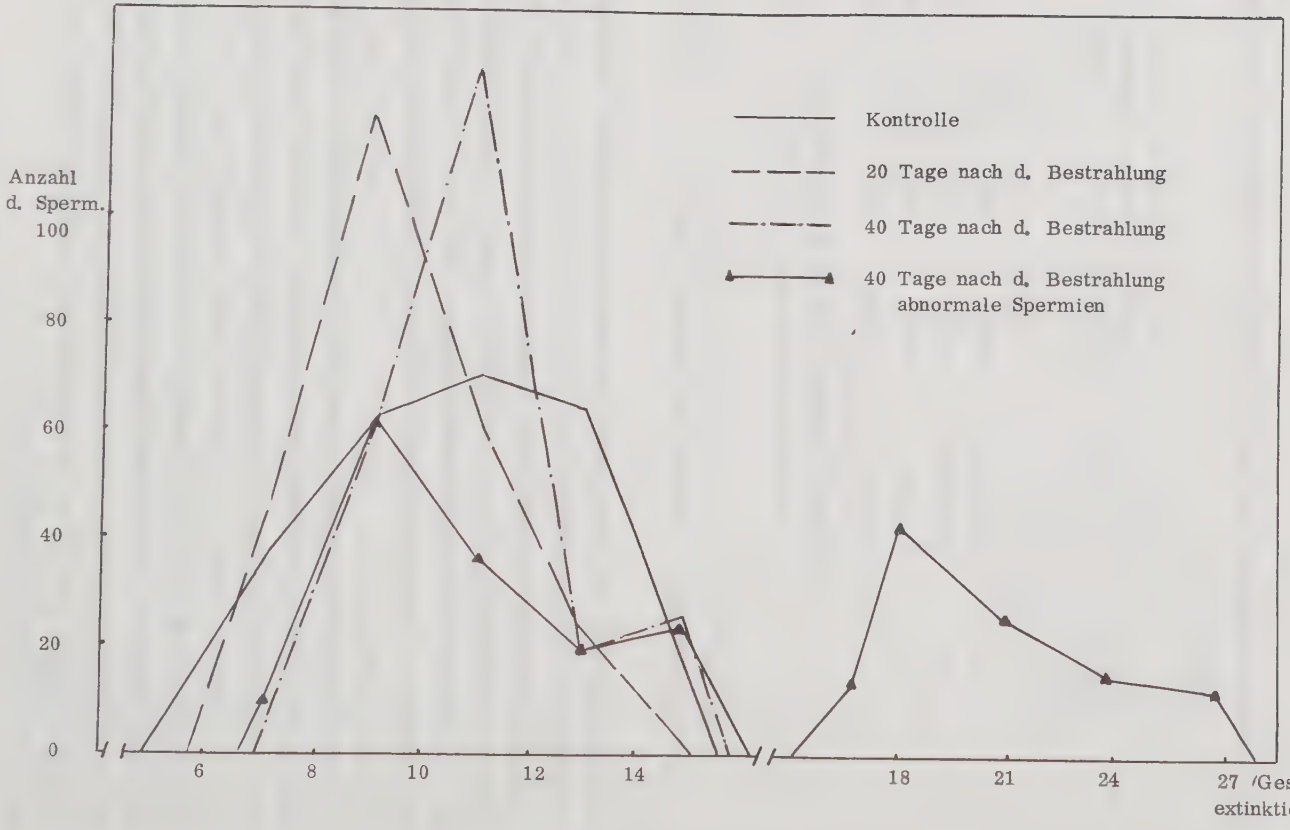
Die hier gemessenen mißgebildeten Spermien wurden nach demselben System ausgewählt wie die für die DNS-Messung.

Die Histon-Werte mißgebildeter Spermien liegen bei allen 5 Bullen wesentlich höher als die der Kontrollperiode (Tab. 7) und die Differenzen der mittleren Histon-Gehalte unterscheiden sich bei allen Bullen signifikant ($P < 0.01$). Zu demselben Ergebnis kommt man, wenn man alle Histon-Werte der 5 Bullen pro Meßperiode zusammennimmt (Tab. 9).

Bemerkenswert ist wieder die große Streuung gegenüber morphologisch normalen Spermien. Der Variationskoeffizient (s%) liegt bei den 5 Bullen zwischen 31 und 39 %, während er bei den normalen Spermien in der Kontrollperiode zwischen 8 % und 17 % schwankt.

Auch hier scheinen 2 Populationen von Spermien vorzuliegen. Es kommen Spermien mit Histon-Gehalten im Bereich haploider und diploider Zellen vor (Abb. 2). Zu den diploiden Spermien wurden solche Zellen gezählt, deren Histon-Gehalt über 16 Arbeitseinheiten lag. Der Anteil der Spermien mit Histon-Werten über 16 AE beträgt bei den einzelnen Versuchstieren 32 - 50 %.

Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der Histon-Werte



E. DISKUSSION

Der DNS-Gehalt der Spermien

Bisher wurde in der Frage nach dem DNS-Gehalt der Spermien meist von morphologisch normalen Spermien ausgegangen, während von morphologisch mißgebildeten Spermien nur wenige Untersuchungen existieren, die teils keine (GLEDHILL 1966b), teils beträchtliche Unterschiede des DNS-Gehaltes gegenüber normalen Spermien nachweisen (MEYHÖFER 1963, STOLLA 1970).

In der vorliegenden Arbeit wurde der DNS-Gehalt morphologisch normaler und abnormaler Spermien an größerem Material untersucht. Zur Erzeugung mißgebildeter Samenzellen wurde, als leicht applizierbare und keine Allgemeinerscheinungen hervorrufende Noxe, die testikuläre Röntgenbestrahlung gewählt. Neben einer Schädigung der Spermatogonien führt eine einmalige Bestrahlung auch zu einer Störung der Spermatogenese zwischen der Metaphase der 1. meiotischen Teilung und dem Abschluß der 2. meiotischen Teilung (LEIDL 1964). Allem Anschein nach ist der zuletzt erwähnte Effekt die Ursache für einen erhöhten Anteil pathologischer Spermien von der 5. Woche p. irrad. an (LEIDL und BERCHTOLD 1964). In den 40 Tage p. irrad gewonnenen Ejakulaten konnten zwischen 8 - 12 % primäre Kopfmißbildungen gefunden werden, wodurch die Gesamtzahl pathologischer Spermien auf 15 - 20 % anstieg. Die mißgebildeten Spermien zeigten ein weites Spektrum an Kopfanormalitäten. Es konnten aber keine typischen Formen von Mißbildungen gefunden werden, die eventuell spezifisch für die Bestrahlung wären.

Als Kontrolle dienten die vor der Bestrahlung gemessenen DNS-Werte, die bei den 5 Bullen zwischen 3.12. - 3.20 x 10^{-12} g lagen. Die vermutlich individuell bedingten Differenzen der mittleren DNS-Gehalte konnten bei 3 Bullen statistisch gesichert werden ($P < 0.05$). Zu gleichlautenden Ergebnissen waren LEIDL und STOLLA (1968) und STOLLA (1970) sowohl in ihren Untersuchungen an Bullen, als auch an anderen Haustieren gekommen. Die Aussage von LEIDL et al. (1971b), wo-

nach gewisse Schwankungen des mittleren DNS-Gehaltes der Spermien zwischen den Individuen auftreten, wird hiermit bestätigt.

In den am 20. Tag p. irrad. gewonnenen Ejakulaten war kein Anstieg der pathologischen Spermien festzustellen. Desgleichen konnte im Vergleich zur Kontrollperiode keine statistisch gesicherte Veränderung des mittleren DNS-Gehaltes beobachtet werden (Tab. 3). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von OAKBERG (1955) und LEIDL und BERCHTOLD (1964) überein, daß die Spermientransformation durch die Röntgenbestrahlung nicht beeinflußt wird. Die Spermien dieser Untersuchungsperiode befanden sich bei einer Länge des Keimepithelzyklus von 13 Tagen und der Nebenhodenpassage von 8 - 11 Tagen zur Zeit der Bestrahlung als Spermatiden in der Transformationsphase. Dagegen lagen die mittleren DNS-Gehalte der im Pachytän bestrahlten normalen Spermien wesentlich niedriger als bei den Kontrollen. Sie unterschieden sich bei getrennter statistischer Auswertung der Einzeltiere in 3 Fällen signifikant ($P < 0.05$, Tab. 3). Faßt man dagegen die DNS-Werte aller Bullen pro Meßperiode zusammen, so ist zwar auch eine Verminderung des DNS-Gehaltes festzustellen, jedoch konnte sie statistisch nicht gesichert werden (Tab. 4). Die Verminderung des DNS-Gehaltes spricht für die Auffassung anderer Autoren (MEYHÖFER 1963, STOLLA 1970), die ein Absinken des DNS-Gehaltes morphologisch normaler Spermien in Ejakulaten mit einem hohen Anteil primärer Mißbildungen beobachteten. Ein Prozentsatz von 10 % primärer Mißbildungen soll schon ein deutliches Absinken des Befruchtungsvermögens bewirken, wobei die verminderte Fertilität wahrscheinlich auf die Funktionsstörungen der Spermien zurückzuführen ist, die als morphologisch normal eingestuft werden (LEIDL et al. 1971a).

Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag auf den morphologisch mißgebildeten Spermien, die im Pachytän bestrahlt wurden und 40 Tage p. irrad. im Ejakulat erschienen. Sie wiesen einen mittleren DNS-Gehalt von $4,15 - 5,23 \times 10^{-12}$ g bei den 5 Bullen auf und unterschieden sich signifikant ($P < 0.01$) von denen der Kontrolle (Tab. 3 und 4). Beachtenswert ist der im Vergleich zur Kontrolle erheblich vergrößerte Variationskoeffizient (s %), der zwischen 34 - 41 % lag. Die Häufigkeitsverteilung der Einzelwerte deutet auf das Vorliegen von 2 Populationen

hin, denn von den 250 untersuchten Spermien wiesen 120 einen Wert in der Höhe haploider Zellen auf (Tabelle 5, D_1 3.01 $\pm$ 0.02), während 130 einen DNS-Gehalt diploider Zellen besitzen (Tabelle 5, D_2 6.13 $\pm$ 0.10). LEIDL et al. (1971 b) vermuten, daß das starke Auftreten von Spermien mit DNS-Gehalten im Bereich diploider Zellen dadurch bedingt ist, daß nur eine meiotische Teilung abläuft. Eine Aneuploidie der Spermien nach Bestrahlung scheint auch durch Fehlverteilung der Chromosomen infolge Verklumpung möglich zu sein (OAKBERG und di MINNO 1960). Vielleicht ist diese Erscheinung die Ursache für das Auftreten mißgebildeter Spermien mit einem im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigerem DNS-Gehalt ($P < 0.05$, Tab. 5).

Die Untersuchungen zeigen deutlich die Unterschiede des DNS-Gehaltes zwischen normalen und mißgebildeten Spermien auf, womit diese Ergebnisse im Gegensatz zu den Feststellungen von GLEDHILL (1966b) stehen, der an pathologisch geformten Bullenspermien zwar eine Verminderung des Feulgen-DNS-Gehaltes, nicht aber des UV-DNS-Gehaltes beobachtete. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß sich die Aussage von GLEDHILL (1966b) auf ein kleineres Untersuchungsmaterial (2 Bullen, 180 abnormale Spermien) stützt, als es in der vorliegenden Arbeit der Fall ist. Weiterhin ist noch nicht geklärt, ob die Veränderung des DNS-Gehaltes der Spermien nicht eine spezifische Erscheinung nach einer Bestrahlung ist. Bei den von GLEDHILL (1966b) untersuchten Bullen ist nur bekannt, daß sie kein normales Befruchtungsvermögen aufwiesen, wobei die Ursache der Störung nicht erwähnt wird.

Um die Frage beantworten zu können, ob es sich nun bei den hier beobachteten Veränderungen des DNS-Gehaltes der Spermien um einen spezifischen Effekt nach Röntgenbestrahlung handelt, müssen weitere Untersuchungen nach Schädigung der Spermatogenese mit anderen Noxen durchgeführt werden.

Der Histon-Gehalt der Spermien

Gleichlaufend mit der DNS-Bestimmung wurde in der vorliegenden Arbeit der Histon-Gehalt normaler und anormaler Spermien untersucht. Färberisch gelingt der Nachweis der Histonproteine mit der Fastgreenfärbung bei pH 8,2 nach ALFERT und GESCHWIND (1953). Da die Färbung von einer Reihe von Präparationsvorgängen abhängig ist, mußte zunächst der Einfluß der experimentellen Faktoren abgeklärt werden.

Als erstes ergab sich die Frage nach Absorptionsmaximum der Histone nach Fastgreenfärbung. Die Wellenlängenabsuchung wurde an mehreren Spermien verschiedener Präparate durchgeführt und zeigte in allen Fällen deutlich ein Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge 640 nm. Die meisten Untersuchungen anderer Autoren wurden im Gegensatz dazu bei den Wellenlängen 600 - 630 nm durchgeführt (JOBST und SANDRITTER 1964, BOSSE und Mitarb. 1970). Bezüglich der Reproduzierbarkeit der Fastgreenfärbung bei cytophotometrischer Messung wurden die Berichte anderer Autoren bestätigt (KRAUS 1963, ROMMEL 1960, BOSSE und Mitarb. 1970): Die Resultate der Fastgreenfärbung sind von vielen Faktoren abhängig, die auch unter standardisierten Arbeitsmethoden nicht ausgeschaltet werden konnten. In den Kontrollmessungen wurden neben der Variation der Extinktionswerte der Spermien an einem engumgrenzten Bezirk des Präparates signifikante Differenzen ($P < 0.01$, Tab. 5) zwischen verschiedenen Stellen des Präparates gefunden, d. h. die Färbeintensität der Spermien variierte sogar in demselben Ausstrich stark. Die Reproduzierbarkeit ist damit in Frage gestellt. Die Aussagekraft der Histonbestimmungen ist deshalb mit diesen Fehlerquellen belastet.

Der Einfluß der Lagerung spielt bei den gefärbten Präparaten keine Rolle, dagegen scheint die Lagerung des fixierten, ungefärbten Präparates eine erhöhte Anfärbbarkeit der Spermien zur Folge zu haben. Gegenüber dem Vergleichspräparat wurde bei einem nach 14-tägiger Lagerung gefärbten Präparat ein signifikanter Anstieg ($P < 0.01$) gefunden. Diese Hyperchromasie könnte auf eine strukturelle Änderung der basischen Proteine während der Lagerung hindeuten.

Es ist äußerst problematisch, die hier beobachteten Veränderungen der Histon-Werte mit den Angaben anderer Autoren zu vergleichen, da einerseits unterschiedliche Methoden und Maßeinheiten verwendet werden, andererseits methodisch bedingte Schwankungen des Histon-Gehaltes auftreten.

Bei diesen Untersuchungen dienten als Kontrolle wieder die vor der Bestrahlung gemessenen Histon-Werte normaler Spermien (Tab. 6). Hier fiel bereits bei den Normalwerten der große Variationskoeffizient (s %) von 8 - 18 % bei den Bullen auf. Ca. 75 % der Kontrollwerte lagen zwischen 8 - 12 Arbeitseinheiten (AE). Der Histon-Gehalt scheint auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht konstant zu sein. Vielmehr bestehen signifikante, individuell bedingte Differenzen zwischen den Einzeltieren (Tab. 8).

Betrachtet man die 20 Tage p. irrad. gemessenen Histon-Gehalte, so sind diese alle niedriger als die der Kontrolle, wobei die Verminderung des Histon-Gehaltes in einem Fall signifikant ist ($P < 0.01$). Die 40 Tage p. irrad. gemessenen Histon-Werte morphologisch normaler Spermien liegen in 2 Fällen niedriger, in 3 Fällen höher als die der Kontrolle, wobei der Anstieg der Werte statistisch gesichert ist ($P < 0.01$). Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Untersuchungen anderer Autoren (LEUCHTENBERGER et al. 1956, MEYHÖFER 1965, BOSSE und Mitarb. 1970), die bei infertilen Individuen teils niedrigere, teils höhere Histon-Gehalte fanden. Die Unterschiede 20 und 40 Tage p. irrad. sind statistisch allerdings nicht zu sichern, wenn man die Histon-Werte der 5 Bullen pro Meßperiode zusammenfaßt.

Der Vergleich aller Histon- und DNS-Werte pro Bulle und Meßperiode zeigt, daß 20 Tage p. irrad. beide Parameter niedriger liegen, als bei der Kontrolle. Dagegen sind die 40 Tage p. irrad. gemessenen Histon-Werte höher, die DNS-Werte aber niedriger, als die der Kontrolle. Ob es sich hier um ein Phänomen handelt, das durch die bereits erwähnte schlechte Reproduzierbarkeit der Fastgreenfärbung oder auf einen tatsächlichen Anstieg der Histon-Werte 40 Tage p. irrad. zurückzuführen ist, kann auf Grund der vorliegenden Untersuchung nicht entschieden werden.

Trotz der Unsicherheit der Färbung lassen sich relativ gute Ergebnisse bei der Histon-Messung morphologisch mißgebildeter Spermien erzielen. So kann hier ein deutlicher Anstieg des Histon-Gehaltes (Tab. 6, 8) verzeichnet werden, der auch statistisch gesichert ist ($P < 0.01$). Der Variationskoeffizient (s %) von 31 - 39 % ist hauptsächlich durch Spermien ($n = 85$), deren Histon-Werte etwa doppelt so hoch sind (16 AE und höher), wie bei den Kontrollen. Damit liegen hier ähnliche Verhältnisse wie bei den DNS-Gehalten vor. Die Messungen bestätigen, daß die Histone in einem konstanten Verhältnis zur DNS stehen und bezogen auf ihre Ploidiestufe den gleichen Histon-Gehalt haben.

Die Fastgreenfärbung scheint zur quantitativen Bestimmung der Histone geeignet zu sein. Eine qualitative Aussage ist aber weitgehend von der Standardisierung der Färbemethode abhängig.

F. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde der DNS- und Histon-Gehalt von morphologisch normalen und anormalen Spermien UV-photometrisch bestimmt. Zur Erzeugung mißgebildeter Spermien wurden die Hoden von 5 Bullen mit 500 R Röntgen bestrahlt. 50 morphologisch normale Spermien von jedem Bullen wurden vor, 20 und 40 Tage nach der Bestrahlung gemessen, zusätzlich 50 morphologisch anomale Spermien pro Bulle 40 Tage p. irrad.
2. Bei den 5 Bullen ergaben sich individuell bedingte signifikante Unterschiede ($P < 0.05$) der mittleren DNS-Gehalte.

3. Die morphologisch normalen Spermien der 5 Bullen wiesen 20 und 40 Tage p. irrad. im Vergleich zu den Kontrollen, eine Verminderung des DNS-Gehaltes auf (3.10 ± 0.02, 3.07 ± 0.02, $3.14 \pm 0.02 \times 10^{-12}$ g, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. $P > 0.05$).

4. Die 40 Tage p. irrad. gewonnenen mißgebildeten Spermien zeigten bei allen 5 Bullen einen erhöhten DNS-Gehalt ($P < 0.01$). Es wurden 120 Spermien mit einem DNS-Gehalt im Bereich haploider ($3,01 \pm 0.02$) und 130 Spermien im Bereich diploider Zellen (6.13 ± 0.10) gefunden. Es wird angenommen, daß die nach Bestrahlung auftretenden Spermien mit mißgebildeten Köpfen Träger von Chromosomenanomalien sind.

5. Gleichlaufend mit der DNS-Bestimmung wurde der Histon-Gehalt normaler und anormaler Spermien mit Hilfe der Fastgreenfärbung bei pH 8.2 nach ALFERT und GESCHWIND (1953) bei der Wellenlänge 640 nm bestimmt.

6. Die Reproduzierbarkeit der Färbung ist nicht gesichert, da bei Kontrollmessungen signifikante Unterschiede ($P < 0.01$) in der Färbeintensität der Spermien innerhalb und zwischen den Präparaten festgestellt werden. Auch die Lagerung des unfixierten Präparates scheint Einfluß auf die Anfärbbarkeit der Spermien zu haben.

7. Der Histon-Gehalt der Spermien der Kontrolle betrug 10,58 $\pm$ 0,15 AE ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). Die Differenz zu den 20 und 40 Tagen p. irrad. gefundenen Werten von (9.51 $\pm$ 0.10, 11,59 $\pm$ 0.16) bei den morphologisch normalen Spermien war nicht signifikant ($P > 0.05$).

8. Die mißgebildeten Spermien vom 40. Tag p. irrad. zeigten einen bedeutend höheren Histon-Gehalt (14.73 $\pm$ 0.38, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $P < 0.01$). 35 % dieser Spermien hatten Histon-Werte im Bereich diploider Zellen.

SUMMARY

1. The DNA- and histone content of morphologically normal and abnormal spermatozoa was determined by UV-Photometry. To produce pathological sperms the testes of 5 bulls were locally x-irradiated with 500 R. 50 morphologically normal spermatozon from each bull were measured before, 20 and 40 days after irradiation and in addition 50 morphologically abnormal sperms per bull on the 40th day p. irrad.
2. Individuell differences of the mean DNA content between the 5 bulls were significant ($P < 0.05$).

3. On days 20 and 40 p. irrad. the morphologically normal sperms of the 5 bulls showed a decrease of the DNA content as compared with control (3.10 ± 0.02, 3.07 ± 0.01, $3.14 \pm 0.02 \times 10^{-12}$ g, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. $P > 0.05$).

4. The pathological spermatozoa collected by means of an artifical vagina 40 days p. irrad. showed an increased DNA content in all 5 bulls ($P < 0.01$). Of the 250 spermatozoa measured, 120 had a DNA content in the range of haploid (3.01 ± 0.02) and 130 in the range of diploid cells (6.13 ± 0.02). It is concluded that the spermatozoa with pathological heads, appearing after x-irradiation, contain abnormal chromosomes.

5. Along with the DNA, the histone content of normal and abnormal spermatozoa was measured by means of Fastgreen staining at pH 8.2 according ALFERT and GESCHWIND (1953) at a wavelength of 640 nm.

6. A repetition of the staining is not ascertained, as control evaluations showed significant differences in the intensity of the staining of the spermatozoa within and between the slides. The storage of the slides, too, seems to have an influence on the staining of the sperms.

7. The histone content of the sperms of the control was 10.58 $\pm$ 0.15 AE ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$). The difference to the values (9.51 $\pm$ 0.10, 11.59 $\pm$ 0.16) found in the morphologically normal spermatozoa on days 20 and 40 p. irrad. was not significant.

8. The pathological sperms of the 40th day p. irrad. showed a significantly higher histone content (14.73 $\pm$ 0.38, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $P < 0.01$). 35 % of these sperms had histone values in the range of diploid cells.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Aehnelt, E. u. J. Hahn (1962): Zur Schwankung der Spermaqualität bei Besamungsbullen unter besonderer Berücksichtigung von Umweltbedingungen. Züchtungskunde 34, 63

Alfert, M. u. I. I. Geschwind (1953): A selektive staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 991

Alfert, M. (1955 a): Changes in staining capacity of nuclear components during cell degeneration. Biol. Bull. 109, 1

Alfert, M. (1955 b): Quantitative cytochemical studies on patterns of nuclear growth. In: Fine Structure of Cells von P. Noordhoff, Gronningen 157

Alfert, M. (1956): Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 109

Alfrey, V. G., Littau, N. C. u. Mirsky, A. E. (1963): On the role of histones in regulating RNA-synthesis in the cell nucleus. Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 414

Anand, A. S., Hoekstra, W. G. u. N. L. First (1967): Effect of aging of boar spermatozoa on cellular loss of DNA. J. Anim. Sci. 26, 171

Arbeiter, K. (1963): Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Heuqualitäten auf die biologische Samenbeschaffenheit von Ziegenböcken. Zuchthyg., Fortpfl. Störungen u. Bes. d. Haustiere 7, 340

Bähr, H. (1965): Mikrospektrophotometrische Untersuchungen zur Bestimmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) in Samenzellen von Bullen. Vet. med. Diss. München

Bhargave, P. M., Bishop, M. W. H. u. T. S. Work (1959): The chemical composition of bull semen with special reference to nucleic acids, free nucleotides and free amino acids. Biochem. J. 73, 242

Berchtold, M. (1963): Spermiogenese. In "Die künstliche Besamung bei den Haustieren "von F. Schaetz, Verlag Gustav Fischer Jena

Berry, R. E. u. Mayer, D. T. (1960): The histon-like basic protein of bovine spermatozoa. Exp. Cell Res. 20, 116

Bloch, D. P. u. G. C. Godman (1955): Evidence of differences in the desoxyribonucleoprotein complex of rapidly proliferating and nondividing cells. J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 531

Bloch, D. P. u. G. C. Godman (1960): Changes in nuclear histones during fertilization and early embryonic development in the pumonate snail, Helix aspera. J, Biophys. Biochem. Cytol. 8, 63

Bloch, D. P. (1962): Synthetic process in cell nucleus. J. Histochem. Cytochem. 10, 137

Bosse, H. G. u. Meyhöfer, W. (1970): Cytophotometrische Messungen des Histonproteingehaltes, des Desoxyribonucleinsäuregehaltes und des Tyrosin/Tryptophangehaltes von Spermien fertiler und subfertiler Männer. Andrologie 2, 23

Bouters, R. Esnault, C., G. W. Salisbury u. R. Ortavant (1967): Discrepancies in analysis of desoxyribonucleic acid in rabbit spermatozoa, involving Feulgen staining (Feulgen-DNA) and ultraviolett light absorption (UV -DNA) measurements
J. Reprod. Fert. 14, 355

Bovin, A., Vendrely, R. u. C. Vendrely (1948): L'acide déoxyribonuclèique du noyau cellulaire, dépositaire des charatères héréditaires, arguments d'ordre analytique.
Compt. rend. Acad. Sci. 226, 1061

Bril-Petersen, E. u. Westenbrink, H. E. K. (1963): A structuell basic protein as a counterpart of desoxyribonucleic acid in mammalian sperm.
Biochim. biophys. Acta 76, 152

Caspersson, T. (1936): Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes.
Skand. Arch. Physiol. 73, Suppl. 8

El Azab, E. Ali (1966): Die Auswirkung lokaler Wärmeapplikation am Skrotum auf Spermatogenese, Reifung der Spermien im Nebenhoden und Spermabeschaffenheit bei Kaninchen und Stieren.
Vet. med. Diss. München

Enesco, H. E. (1968): A cytophotometric analysis of histones in aging.
Third intern. Congress on Histochemistry and Cytochemisty. New York Aug. 18.-22. 1968 Summary Reports, Springer Verlag New York Inc.

Esnault, C. u. R. Ortavant (1967): Origine des spermatozoides diploides présents dans l'ejaculat d'un taureau charolais.
Ann. Biol. anim. Biochem. Biophys. 7, 25

Feulgen, R. u. Rossenbeck, H. (1924): Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure von Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.
Z. Physiol. chem. 135, 203

Gledhill, B. L. (1955): Cytophotometry of presumed diploid bull Spermatozoa.
Nord. Vet. Med. 17, 328

Gledhill, B. L. (1966 a): Studies on the DNA content, nuclear protein and dry mass of bull spermatids and spermatozoal heads with aspects on fertility.
Tryckeri Balder AB Stockholm

Gledhill, B. L. (1966 b): Studies on the DNA content, dry mass and optical area of morphological normal and abnormal bull spermatozoal heads.
Acta vet. scand. 7, 1

Gledhill, B. L. M. P. Gledhill, R. Rigler, jr. u. N. R. Ringertz (1966): Changes in desoxyribonucleoprotein during spermatogenesis in the bull.
Exp. Cell Res. 41, 625

Gledhill, B. L., I. Gustavson, u. B. Henricson (1970): DNA content of presumed aneuploid spermatozoa.
Hereditas 65, 291

Götze, R. (1949): Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.
Verl. Schaper, Hannover

Hochereau de Reviers, M. T. (1970): Etudes des divisions spermatogonales et du renouvellement de la spermatogonic souche chez le taureau.
Thèse Doct. d'Etat Es-Sciences Mat., Paris

Irvin, J. D., D. Holbrock, J. H. Evans, H. C. Allister u. E. P. Stiles (1963): Possible role of histones in regulating of nucleic acid synthesis.
Exp. Cell Res. 9, 359

Jansen, M. T. u. Leeflang, C. W. (1966): Feulgen-DNA content of individual bull spermatozoa.
Exp. Cell Res. 44, 614

Jobst, K. u. Sandritter, W. (1964): Über den quantitativen histochemischen Nachweis von basischen Kernproteinen mit Gallocyaninchromalaun.
Histochemie 4, 277

Karlson, P. (1962): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.
Georg Thieme Verlag Stuttgart

Koefoed-Johnson, H. H. (1960): Influence of ejaculation frequency on the time required for sperm formation and epididymal passage in the bull.
Nature 185, 49

Kramer, M.-F. (1968): DNA content of spermatozoa in fertile and infertile bulls and errors in its determination.
Biol. anim. Biochem. Biophys. 8, 217

Kraus, H. (1963): Der histochemische Nachweis der Histone bei pH 8.2
Acta histochem. Suppl.-Bd. VI, 349

Lederer, B. u. Sandritter, W. (1966): Sukzedane cytophotometrische Bestimmung von Desoxyribonucleinsäure, Histon und Gesamtprotein.
Histochemie 7, 288

Leidl, W. (1964): Degeneration und Regeneration des Keimepithels beim Bullen nach Röntgenbestrahlung.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 71, 670

Leidl, W. und Berchtold, M. (1964): siehe Anhang

Leidl, W. (1966): Zur Diagnose von Fruchtbarkeitsstörungen beim Bullen.
Fortpfl. Haust. Bd. 2, 179

Leidl, W. und Stolla, R. (1969): Individual difference of UV-DNA in spermatozoa of boars.
J. Reprod. Fort. 18, 173

Leidl, W., Schefels, W., Stolla, R. u. Metzger, E. (1971a): Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 129

Leidl, W., Stolla, R., Botzenhardt, A. (1971b): Der DNS-Gehalt normaler und abnormaler Spermien (unveröffentlicht)

Leuchtenberger, C., Schrader, F., Weir, D. R. u. D. P. Gentile (1953): The desoxyribonucleic acid (DNA) content in spermatozoa of fertile and infertile human males.
Chromosoma 6, 61

Leuchtenberger, C. I. Murmanis, L. Murmanis, S. Ito u. D. R. Weir (1956): Interferometric dry mass and microspektrophotometric arginine determinations on bull sperm nuclei with normal and abnormal DNA content.
Chromosoma 8, 73

Leuchtenberger, C. (1958): Qualitative determination of DNA in cells by Feulgen mikrospectrophotometry.
In: General Cytochemical Methods, Vol. 1, pp. 221 Ed. J. F. Danielli Acad. Press, N. Y.

Mac Leod, J. (1952): Certain concepts in human male fertility.
J. Urology 67, 19

Mann, T. (1964): The biochemistry of semen.
Methuen London

Meyhöfer, W. (1963): Mikrospektrophotometrische Messungen des Nucleinsäuregehaltes von Spermien fertiler und infertiler Männer. Arch. klin. exp. Derm. 216, 556

Meyhöfer, W. (1965): Beitrag zur cytophotometrischen Beurteilung pathologisch veränderter Samenzellen unter besonderer Berücksichtigung der Rundspermatozoen nach Feulgen- und Fastgreenfärbung. Z. Haut-Geschlechtskrankh. 39, 174

Meyhöfer, W. (1968): Die Bedeutung cytophotometrischer Untersuchungen an Spermatozoen zur Erfassung der ehelichen Sterilität. In: Beiträge zur Fertilität und Sterilität 5. Folge

Monesi, O. (1962) Relation between x-rays sensitivity and stage of the cell cycle in spermatogonia of the mouse. Radiat. Res. 17, 809

Nieberle und Cohrs, P. (1962): Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Gustav Fischer Verlag Stuttgart

Noeske, K. u. Ebner, H. (1965): Zum Problem der Hyperchromasie. Verh. d. dt. Gesell. für Path. 49. Tagung Saarbrücken 6.-9. Juni 1965 Fischer Verlag Stuttgart

Oakberg, E. F. (1955): Sensitivity and time of degeneration of spermatogonic cells irradiated in various stages of maturation in the mouse. Radiat. Res. Vol. 2, 4, 369

Oakberg, E. F. u. Di Minno, R. L. (1960): X-ray sensitivity of primary spermatocytes of mouse. Int. J. Radiat. Biol. 2, 196

Oakberg, E. F. u. Clark, E. (1964): Species comparison of radiation respons of the gonads.
Proc. Int. Symp. Effect of Son. Radiation on the Reproductive System, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris

Ortavant, R. (1956): Autoradiographie des allules germinales du testicule de bélier. Durée des phénoménes spermatogénétique.
Arch. Anat. Microsc. 45, 1

Ortavant, R. (1959): Spermatogenesis and Morphology of the Spermatozoon.
In: Reproduction in Domestic Animals von Cole, H. H. and Cups, P. T. II, 1

Parez, M., Petel, J. P. u. Vendrely, C. (1960): Sur la teneur en acide désoxyribonuleique des spermatozoides de toureaux présentant differents degrés de fécondite.
C. R. Acad. Sci. Paris 251, 2581

Phillips, D. M. P. (1962): The Histones
Progress in Biophysics and Biochemistry 12, 211

Ringertz, N. R. und Zetterberg, A. (1966): Cytochemical demonstration of histones and protamines.
Exp. Cell Res. 42, 423

Rommel, P. (1960): Über den DNS-Gehalt und Histonproteingehalt von Zellen der Gewebekultur.
Diss. Frankfurt

Rugh, R. (1960): General Biology
In: Mechanism of Radiobiology, M. Errera und A. Forssberg, eds., Vol. 2, p. 1
Acad. Press, New York

Salisbury, G. W. u. F. N. Baker (1966): Frequency of occurance of diploid bovine spermatozoa.
J. Reprod. Fert. 11, 477

Sandritter, W. (1958): Ultraviolettmikrospektrophotometrie
Aus: Handbuch der Histochemie Bd. I, 1
Herausgeber: W. Graumann und K. Neumann
Fischer Verlag Stuttgart

Sandritter, W., Müller, D. u. O. Gensecke (1960): Ultraviolettmikrospektrophotometrische Messungen des Nucleinsäuregehaltes von Spermien und diploiden Zellen.
Acta Histochem. 10, 139

Sandritter, W. u. Grosser, K. D. (1964): Quantitative histochemische Untersuchungen an Spermien.
Symp. Biol. Hung. 4, 63

Schwift, H. (1955): The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei.
Physiol. Zool. 23, 169

Stedmen, E. and F. Stedmen (1951): The basic protein of cell nuclei.
Phil. Trans. Royal Soc. Ser. B 235, 565

Stolla, R. (1968): Ultraviolettmikrospektrophotometrische Untersuchungen an Samenzellen unter besonderer Berücksichtigung des DNS-Gehaltes der X- und Y-Spermien.
Vet. med. Diss. München

Stolla, R. (1970): Neue Ergebnisse auf dem Gebiet der quantitativen DNS-Bestimmung von Spermien.
1. Europäisches Kolloquium über Zytogenetik und Säugetierkunde Giesen
12./13. Okt. 1970

Snedecor, G. W. (1962): Statistical methods.
Iowa State Collage Press

Summerhill, W. R. u. D. Odds (1961): Levels of desoxyribonucleic acid in bovine spermatozoa and their relationship to fertility.
J. Dairy Sci. 44, 548

Vendrely, R. u. Vendrely, C. (1948): La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucleique à travers les organs, les individus et les espéces animales.
Experientia 4, 434

Vendrely, R. u. Vendrely, C. (1953): Arginine and desoxyribonucleic acid content of erythrocyte nuclei and sperm of some fishes.
Nature 172, 30

Vendrely, C. (1965): Protamine und Histone als wichtige Bestandteile des Zellkernes.
Med. Welt 968-974

Walker, P. M. B. u. H. B. Yates (1952): Ultraviolett-absorption of living cell nuclei during growth and division.
Symposia Soc. Exptl. Suppl. 4, 97

Watson, J. D. u. Crick, F. H. C. (1953): A structure for desoxyribose nucleic acid.
Nature 171, 737

Wollrab, J. (1965): Übersicht über die angeborene und erworbene Hodeninsuffizienz.
In: Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren von D. Küst u. F. Schaetz, Enke Verlag Stuttgart

Leidl, W. und Berchtold, M. (1964): Die Auswirkung testikulärer Röntgenbestrahlung auf das Keimepithel und die Spermabeschaffenheit beim Bullen.
Bericht üb. d. V. Int. Kongr. üb. d. tier. Fortpflanzung und die künstl. Besamung. Trient, Bd. III, 408

Herrn Prof. Dr. W. Leidl möchte ich für die Überlassung des Themas und für seine freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. R. Stolla für seine Anleitung und Förderung, die er mir bei der Durchführung der Arbeit zuteil werden ließ.

LEBENSLAUF

Am 6. Juli 1944 wurde ich, Albrecht Botzenhardt als Sohn des Dipl. -Landwirtes Albrecht Botzenhardt und seiner Ehefrau Luitgard, geb. Bingger in Angerapp (Ostpreussen) geboren.

Im Jahre 1944 kehrten meine Eltern in die Heimat meines Vaters, nach Kempten, zurück. Dort besuchte ich von 1950 - 1954 die Volksschule. 1954 trat ich in die Oberrealschule Kempten ein, wo ich im Juni 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich im Wintersemester 1965 mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München. Hier bestand ich im September 1970 die tierärztliche Prüfung.

Seit Oktober 1970 beschäftigte ich mich mit meiner Dissertationsarbeit an der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München.